

Antti Kivimäki
Inhalaattorien laadunvalvonta-analyysin
kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Insinööri
Bio- ja elintarviketekniikka
Opinnäytetyö
10.3.2011

Tekijä Otsikko	Antti Kivimäki Inhalaattorien laadunvalvonta-analyysin kehittäminen
Sivumäärä Aika	47 sivua + 1 liite 10.3.2011
Tutkinto	insinööri
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	laatu ja ympäristö
Ohjaajat	erikoistutkija Terhi Mattila lehtori Mikko Halsas
<p>Tämä insinöörityö käsittelee Orionin lääke-tehtaalla tehtyä laboratoriomenetelmän kehitystyötä. Työni tavoitteena oli kehittää nopeampi ja kevyempi menetelmä astmalääkeinhalaattorien testaamiseen. Astma ja keuhkohtauma ovat yleisiä sairauksia ja niihin käytettävien lääkkeiden myynti on kasvussa. Siksi on tärkeää, että inhalaattorien testaamiseen on olemassa toimiva ja luotettava menetelmä.</p> <p>Analyysissa tutkittava lääkejauhe imetään inhalaattorista analyysiputkeen pumpun avulla. Tämän jälkeen se liuotetaan. Liuoksesta otetaan näyte, jonka lääkeainepitoisuus analysoidaan nestekromatografilla.</p> <p>Menetelmää kehiteltiin ottamalla eri lääkeaineita sisältävistä inhalaattoreista näytteitä ja liuottamalla ne käyttäen erilaisia koneellisia ravisteluja. Ravistelut poikkesivat toisistaan kestoltaan ja kierrosnopeudeltaan. Tuloksia verrattiin aiempiin, hyväksytyillä menetelmillä samoista näytteistä saatuihin tuloksiin. Lisäksi kehiteltiin kokonaan uutta analyysiputkea näytteen ottoa varten, sillä markkinoilla olevassa putkessa on joitakin rakenteellisia heikkouksia.</p> <p>Työn kuluessa saatiin kehitettyä menetelmä, joka nopeuttaa huomattavasti inhalaattorien analyysia ja mahdollistaa rinnakkaisnäytteiden tekemisen. Ennen kuin menetelmää voidaan alkaa käyttää laadunvalvonnassa, sillä on tehtävä vielä lukuisia rinnakkaisnäytteitä ja varmistettava, että ne antavat hyväksytyt tulokset. Myös automaattisen robotin käyttöä analyysin helpottamiseksi suunnitellaan. Lisäksi insinöörityön tuloksena saatiin kehitteillä olevasta analyysiputkesta muokattua toimiva versio.</p>	
Avainsanat	inhalaattori, laadunvalvonta, ravisteliija, menetelmän kehitys

Author Title	Antti Kivimäki Development of quality control method of inhalers
Number of Pages Date	47 pages + 1 appendix 10 March 2011
Degree	Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Quality and Environmental Management
Instructors	special researcher Terhi Mattila senior lecturer Mikko Halsas
<p>This thesis reports on the development of a laboratory method that was made at the Orion Oyj pharmaceutical plant. The aim of the thesis project was to develop a quicker and lighter method for the testing of asthma medicine inhalators. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease are common diseases, and the sale of medicine used to treat them is growing. Therefore, it is important that there is a functional and reliable method for inhalator testing.</p> <p>In the analysis, the medicine powder analyzed is sucked into a collecting tube by a pump. After this it is dissolved. A sample is taken from the solution, and its medical substance quality is measured with a liquid chromatograph.</p> <p>The method was developed by taking samples from inhalators containing different medicines and by dissolving them by using different mechanical shakings. The shakings deviated from each other by duration and spinning speed. The results were compared to previous results that were measured by an acknowledged method. In addition, a new analysis tube was developed for the sample collection because the analysis tube on the market has some structural deficiencies.</p> <p>A new method that quickens the inhalator analysis significantly and enables simultaneous handling of concurrent samples was developed during the project. Before the new method can be applied to quality control, several concurrent samples must be analyzed with it to make sure that it gives acceptable results. There are also plans for the use of an automatic robot to make the analysis easier. Additionally, a properly functioning version was modified from the analysis tube that was in development stage.</p>	
Keywords	inhalator, quality control, shaker, method development

Sisällys

Termit	1
1 Johdanto	1
2 Hengitysteiden rakenne	1
3 Astma	3
3.1 Astman vaikutus hengitysteihin	3
3.2 Astman riskitekijät	4
3.3 Astman hoito	5
4 Keuhkohtaumatauti	5
4.1 Määritelmä	5
4.2 Krooninen keuhkoputkentulehdus	6
4.2.1 Kehittyminen	6
4.2.2 Oireet	6
4.3 Keuhkolaajentuma	6
4.3.1 Kehittyminen	6
4.3.2 Oireet	7
4.4 Hoito	7
5 Hengitysteiden sairauksien hoitoon käytetyt lääkeaineet	7
5.1 Kortikosteroidit	7
5.2 Keuhkoputkia laajentavat lääkkeet	8
5.2.1 β 2-sympatomimeetit	8
5.2.2 Antikolinergit	9
6 Orion Oyj	10
6.1 Orionin tärkeimmät tuotteet	11
6.2 Orionin valmistamat astmalääkkeet	11
6.2.1 Easyhaler	11
6.2.2 Inhalaattorituotteet	13
7 Menetelmän kehittämissä käytetyt tuotteet	13

8	Kokeissa käytetyt laitteet	14
8.1	Analyysiputket	14
8.1.1	Lasiputki	14
8.1.2	Copleyn putki	14
8.1.3	Aforen putki	16
8.2	Ravistelijat	18
8.2.1	Heidolph	18
8.2.2	Turbula	19
8.3	Kromatografi	20
9	Analyysimenetelmä	21
9.1	Virtausnopeuden määrittäminen	21
9.2	Mittaus	21
10	Työturvallisuus	23
10.1	Tutkittavien näytteiden aiheuttamat riskit	23
10.2	Liuottimet	24
11	Mittausmenetelmän kehittäminen	24
11.1	Näytteiden määrä	24
11.2	Pesun selvitys	25
11.3	Ravistelunopeuden vaikutuksen selvitys	25
11.4	Ravisteluajan vaikutuksen selvitys	25
11.5	Uusitun Aforen putken testaus	26
12	Tulokset	26
12.1	Hyväksyttävien tulosten rajat	26
12.2	Mitatut tulokset	27
13	Johtopäätökset	28
13.1	Pesun vaikutus tuloksiin	28
13.2	Ravistelunopeuden vaikutus	29
13.3	Ravisteluajan vaikutus	31
13.4	Uusittu Aforen putki	32
14	Mahdolliset virhelähteet	33
14.1	Inhalaattori	33

14.2	Liuokset	34
14.3	Imu	36
14.4	Ohivirtaus	36
14.5	Suodatin	36
14.6	Analyysiputki	38
14.7	Ympäristö	39
15	Testausmenetelmän kehittäminen tulevaisuudessa	39
15.1	Testauksen ongelmakohdat	39
15.2	Testaus jatkossa	40
15.3	Hahmotelma analyysille ravistelijaa ja robottia hyödyntäen	41
16	Yhteenveto	43
Liitteet		
Liite 1. Kromatografiajoiden kuvaajia		

Termit

Antagonisti	Lääkeaine, joka estää toisten lääkeaineiden vaikutusta
Basofiili	Yksi veren valkosoluista; aktivoituu astman reaktioista
Detektori	Ilmaisin; vastaanottaa fysikaalisen signaalin ja tuottaa mitattavissa olevan vasteen
Diagnostinen	Diagnoosiin eli terveyden ongelman syyn selvittämiseen tähtäävä
Entsyymi	Katalyytti, joka nopeuttaa biokemiallisia reaktioita
Geneerinen lääke	Lääke, jonka patentti on umpeutunut ja jota muut valmistajat voivat valmistaa omilla tuotenimillään
Histamiini	Monoamiini, joka toimii ihmiskehossa keskushermoston välittäjäaineena
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; korkean erotuskyvyn nestekromatografia
Inhalaattori	Laite, jonka avulla lääkeaine saadaan otettua kehoon keuhkojen kautta
Inhiboida	Estää
Kolonne	Putki, jota käytetään aineiden erottamiseen toisistaan virtauksen avulla
Kromatografi	Laite, joka erottelee erilaiset aineet toisistaan niiden liukoisuuserojen perusteella
Nollanäyte	Näyte, joka ei sisällä tutkittavaa ainetta
Reseptori	Vastaanottava kohta tai elin
Rpm	Rounds Per Minute; kierrosnopeus
Sentrifugointi	Seoksen partikkelien erottelu toisistaan keskipakoisvoimalla niiden koko- ja tiheyserojen perusteella
Taaraus	Vaa'an nollaus siten, että tutkittava esine on siinä; näin esineen painon muutos nähdään suoraan
Tuma	Solun osa, jonka sisällä DNA sijaitsee
Vial	Pieni lasipullo

1 Johdanto

Tämä insinöörityö käsittelee astmalääkeinhalattorien laadunvalvonnassa käytettävän analyysimenetelmän kehitystyötä, jonka tein Orion Oyj:n lääkeyhtiöllä kesällä 2010. Orion on Espoossa toimiva lääkealan yritys, joka on alan suurin toimija Suomessa ja jonka tärkeimpiin tuoteryhmiin astmalääkkeet kuuluvat.

Tällä hetkellä käytössä oleva analyysimenetelmä on työvoimavaltainen ja hidas. Koska tuotantomäärät ovat suuria ja jokaisen valmistetun tuote-erän onnistuminen on varmistettava, vapauttaisi menetelmän nopeutus työntekijöitä muihin tehtäviin. Käytössä oleva menetelmä on myös fyysisesti raskasta analyysin tekijälle.

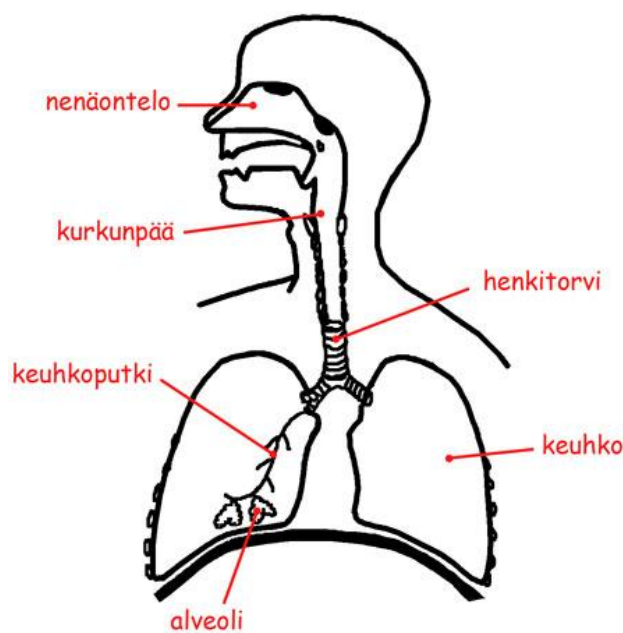
Tavoitteena työssäni oli kehittää analyysimenetelmää siten, että näytteiden valmistelussa nestekromatografista mittausta varten hyödynnettäisiin koneellisia ravistelijoita sekä uudenlaisia annoksen ottoon tarkoitettuja analyysiputkia. Tämä lyhentäisi näytteen valmisteluun kuluva aikaa; lisäksi se keventäisi työtä huomattavasti.

Menetelmää kehiteltiin valmistelemalla kahdesta erilaisesta inhalaattorista otettuja näytteitä nestekromatografimittaukseen koneellisilla ravisteluilla, jotka poikkesivat toisistaan kestoiltaan ja kierrosnopeudeltaan. Näytteet analysoitiin kromatografilla, ja saatuja mittaustuloksia verrattiin aiemmin saatuihin, hyväksytyihin tuloksiin. Myös erilaisten ravistelijoiden sekä näytteenottoon kehitettyjen putkien vaikutusta tuloksiin tutkittiin, minkä lisäksi kehiteltiin kokonaan uutta näytteenottoputkea analyysia varten. Työ tehtiin yhteistyössä Orionin Kemiallisen laadunvalvontaosaston sekä Tutkimus- ja tuotekehitysosaston kanssa.

2 Hengitysteiden rakenne

Hengitystiet muodostuvat ylä- ja alahengitysteistä. Ylähengitysteihin kuuluvat nenäontelo, suuaukko, nielu ja kurkunkää; alahengitysteihin puolestaan henkitorvi sekä keuhkoputket. Keuhkoputket alkavat henkitorven haarautumiskohdasta ja haarautuvat

säännöllisesti yhä pienemmiksi keuhkoputkiksi. Keuhkoputkia seuraavat ilmatiehyet, jotka ovat alle 1 mm halkaisijaltaan olevia rustottomia keuhkoputken haaroja. Ilmatiehyet haarautuvat hengitystiehyeksi, joiden seinämissä on joitakin keuhkorakkuloita. Hengitystiehyet haarautuvat edelleen keuhkorakkulatatiehyeksi. Nämä päättyvät keuhkorakkuloiden eli alveolien muodostamiin keuhkorakkulasäkkeihin, joissa hapen ja hiilidioksidin vaihto tapahtuu. Hengitysteiden rakenne on nähtävissä kuvassa 1. (1, s. 14; 2, s. 23)



Kuva 1. Hengitysteiden rakenne (3)

Henkitorven ja keuhkoputkien seinämä muodostuu neljästä kerroksesta. Uloimmaisena oleva kerros muodostuu lihaksesta. Tämän sisällä on mukoosa eli limakalvo. Limakalvon pinnalla kasvaa värekarvasoluja sekä limaa tuottavia pikarisoluja. Pikarisolujen tuottamasta limasta muodostuu sisimmäinen kerros. Keuhkoihin hengitysilman mukana tulleet epäpuhtaudet tarttuvat limaun. Värekarvojen jatkuva liike kuljettaa limaa nielua kohti, mistä se voidaan yskiä pois. (1, s. 15-16; 4, s. 101)

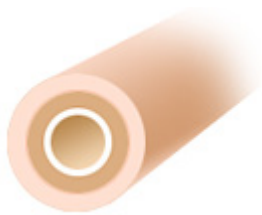
Keuhkojen pääasiallinen tehtävä on huolehtia elimistön ja ulkoilman välillä tapahtuvasta hapen ja hiilidioksidin vaihdunnasta. Kaasujen vaihto koostuu kolmesta vaiheesta: keuhkorakkuloiden tuuleuksesta, kaasujen diffuusiosta eli molekyylien siirtymisestä väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan keuhkorakkuloiden ja keuhkojen hiussuonten välillä sekä kaasujen kuljetuksesta verenkierrassa. Lisäksi

keuhkot lämmittävät, kosteuttavat ja puhdistavat sisään hengitettävää ilmaa. (2, s. 34-35)

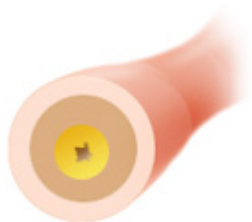
3 Astma

3.1 Astman vaikutus hengitysteihin

Normaalisti limakalvon pinnalla on runsaasti värekarvasoluja ja vain muutamia pikarisoluja. Astmassa värekarvasolut ovat vaurioituneet ja pikarisolujen määrä on lisääntynyt. Tämän vuoksi sitkeän liman erittyminen on lisääntynyt, mistä seuraa tulehdus. Tämä puolestaan aiheuttaa limakalvon turvotusta. Astman vaikutukset keuhkoputkeen ovat nähtävissä vertailemalla kuvia 2 ja 3. Turvonneen limakalvon kyky sietää ärsykejä, kuten tupakansavua, pölyä tai räsistä, on heikentynyt, mikä johtaa keuhkoputken lihasten supistumiseen. (1, s. 15- 16)



Kuva 2. Terveen keuhkoputken läpileikkaus. (5)



Kuva 3. Astmaan sairastuneen henkilön keuhkoputken läpileikkaus. (5)

Keuhkot huolehtivat sekä elimistön hapensaannista että hiilidioksidin poistumisesta. Ilman siirtyminen keuhkoihin perustuu rintakehän ja pallean liikkeiden aiheuttamiin rintaontelon painevaihteluihin. Uloshengitys on normaalisti passiivinen tapahtuma, mutta voimakkaassa uloshengityksessä käytetään apuna vatsalihaksia ja sisempiä kylkivälilihaksia. Astman oireet aiheuttavat uloshengityksen vaikeutumisen keuhkoputken tilavuuden pienentyttyä. (1, s. 16)

Astmaatikolle tyypillistä on ajoittainen hengenahdistus, mikä erityisesti taudin alkuvaiheessa liittyy johonkin tiettyyn ärsytystilanteeseen (1, s. 16). Myös keuhkojen limaneritys pikarisolujen kiihtyneen toiminnan seurauksena sekä yskä ja hengityksen vinkuminen ovat tavallisia oireita (2, s. 322).

3.2 Astman riskitekijät

Astma kasautuu perheittäin. Astmaan sairastuneen henkilön lapsilla, sisaruksilla ja vanhemmilla on yli kaksinkertainen riski sairastua verrattuna sellaiseen henkilöön, jonka perheessä astmaatikkoja ei ole. Kaksostutkimuksissa on osoitettu, että kasautuminen johtuu nimenomaan perintötekijöistä eikä perheen yhteisestä elinympäristöstä. Lapsena pojilla on suurempi riski sairastua astmaan, mutta murrosiässä ero tasoittuu. Myös ylipainoisilla sekä atooppisilla henkilöillä eli niillä, joilla on verikokein todettavia allergiavasta-aineita, on suurempi riski sairastua astmaan. (1, s. 18)

Säännöllinen tupakointi, erityisesti nuorilla, lisää riskiä sairastua astmaan. Myös passiivinen tupakointi kasvattaa riskiä. Äidin tupakoidessa raskausaikana on sikiöllä suurempi riski sairastua astmaan. (1, s. 18) Tupakoinnin aikana limaneritys lisääntyy, värekarvoituksen toiminta häiriintyy, kolinergiset eli asetyylikoliinia erittävät reseptorit stimuloituvat, limakalvon läpäisevyys kasvaa ja immuunijärjestelmän solujen toiminta häiriintyy. Limakalvon läpäisevyyden lisääntyminen lisää allergeenien pääsyä hengityksestä immuunijärjestelmään. (2, s. 326-327)

Asuinolot voivat edistää astman kehittymistä. Liiallinen kosteus sekä homevauriot yhdistettynä huonoon ilmanvaihtoon lisäävät astman riskiä. Myös keinokuitutekstiilien käytöllä on todettu astmaa lisäävä vaikutus, sillä ne suosivat pölypunkkien lisääntymistä. (1, s. 18-19)

Ravinnon vaikutus astmariskiin on hieman epäselvä. Joissakin tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että vähäinen magnesiumin, C-vitamiinin ja kalan saanti saattaisivat lisätä astma-alttiutta. Myös runsas ruokasuolan ja kovetettujen kasvirasvojen määrä saattavat olla riskitekijöitä. (1, s. 19) Erityisruokavalioista on kuitenkin vain vähän hyötyä astmaa hoidettaessa (2, s. 327).

Virusten aiheuttamat hengitystietulehdukset pahentavat astman oireita. Ei kuitenkaan ole näyttöä siitä, että ne voisivat aiheuttaa astman. Vaikuttaa kuitenkin siltä, että immuunipuolustukseen voimakkaasti vaikuttavat sairaudet, kuten tuberkuloosi, tuhkarokko ja A-hepatiitti, estävät astman puhkeamista. (1, s. 19)

Maatiloilla kasvaneilla lapsilla on todettu vähemmän astmaa kuin ikätovereillaan. Vaikutus on erityisen suuri, jos kotitilalla on pidetty karjaa. Tämän vuoksi on arveltu, että varhaisempi ja laajempi altistuminen erilaisille mikrobeille ohjaa immuunipuolustusta pois allergian suunnasta ja näin vähentää riskiä sairastua astmaan. (1, s. 19)

3.3 Astman hoito

Aiemmin astmaa pidettiin kroonisena sairautena, jota voidaan vain yrittää hillitä, muttei parantaa. On kuitenkin todettu, että potilas tervehtyy useimmiten täysin oireettomaksi alkavasta astmasta. Hoito varhaisessa vaiheessa on tärkeää, sillä pitkään jatkunut limakalvotulehdus voi muuttua krooniseksi ja aiheuttaa keuhkoputken seinämään rakenteellisia muutoksia. (2, s. 326)

4 Keuhkohtaumatauti

4.1 Määritelmä

Keuhkohtaumatauti liittyy sairauskompleksiin, joka koostuu kolmesta tekijästä: kroonisesta keuhkoputkentulehduksesta, enfyseemasta eli keuhkojen laajentumasta sekä kroonisesta progressiivisesta hengitysteiden ahtaumasta. Krooninen keuhkoputkentulehdus on kansainvälisen määritelmän mukaan tilanne, jossa henkilöllä on ollut yskää tai ysköksiä kahtena peräkkäisenä vuonna vähintään kolmen kuukauden ajan. Enfyseema tarkoittaa terminaalisten ilmasteiden keuhkorakkula-alueen tuhoutumista. Keuhkohtaumataudista käytetään myös termiä COPD (chronic obstructive pulmonary disease). (2, s. 353)

4.2 Krooninen keuhkoputkentulehdus

4.2.1 Kehittyminen

Kroonisen keuhkoputkentulehduksen keskeisin syy on tupakointi. Pitkäaikainen altistuminen keuhkoputkia ärsyttävillä aineilla, kuten tupakansavulle, saattaa johtaa kroonisen keuhkoputkentulehduksen muodostumiseen. Limakalvot ärsyyntyvät tupakansavun sisältämien aineiden vaikutuksesta, mikä kiihdyttää limantuotantoa. Ärsytyksen jatkuessa pitkään limarauhaset ja pikarisolut lisääntyvät ja laajenevat, jolloin limaneritys pahenee entisestään. (4, s. 100-101)

Tupakansavu vaurioittaa myös värekarvoja, mikä heikentää niiden kykyä kuljettaa limaa pois keuhkoputkista. Värekarvojen toiminnan heikentyessä ylimääräinen lima jää keuhkoputkiin, mikä edistää bakteerien kasvua ja aiheuttaa uusiutuvia tulehduksia. Värekarvat tuhoutuvat lopulta kokonaan limakalvon vaurioituttua riittävän pahasti. (4, s. 101)

4.2.2 Oireet

Tyypillinen kroonisen keuhkoputkentulehduksen oire on itsepintainen yskä, erityisesti heti heräämisen jälkeen. Muita oireita ovat ajoittainen hengityksen vinkuminen sekä asteittainen rasituksensietokyvyn heikkeneminen. Edettyään pitkälle krooninen keuhkoputkentulehdus voi yhdessä keuhkolaajentuman kanssa johtaa levossa esiintyvään hengenahdistukseen, jolloin henkilö pystyy kävelemään enää vain muutaman askeleen pysähtymättä. (4, s. 100-101)

4.3 Keuhkolaajentuma

4.3.1 Kehittyminen

Tupakointi on yleisin keuhkolaajentuman aiheuttaja. Valkosolut, jotka kerääntyvät keuhkorakkuloihin tupakansavun aiheuttaman tulehduksen vaikutuksesta, erittävät keuhkorakkuloiden seinämiä tuhoavia entsyymejä. Alfa-1-antitrypsinientsyymi kumoaa normaalisti näiden entsyymien vaikutuksen, mutta tupakansavu estää sen toiminnan. (4, s. 101-102)

Keuhkolaajentuma voi kuitenkin aiheutua myös perinnöllisestä alfa-1-antitrypsiinientsyymin puutteesta. Myös ilmansaasteet, toistuvat hengitystieinfektiot ja hengityselinten allergiset sairaudet saattavat edistää keuhkolaajentuman kehittymistä. (4, s. 101-102)

Keuhkoahdauma aiheuttaa pysyviä muutoksia keuhkorakkuloissa, joissa hapen ja hiilidioksidin vaihto tapahtuu. Pienet keuhkorakkulat tuhoutuvat ja yhtyvät suuremmiksi yksiköiksi, jolloin niiden pinta-ala pienenee. Ne eivät tuuletetu kunnolla, ja niihin johtavat velttoseinäiset keuhkoputket menevät helposti tukkoon uloshengityksen aikana, mikä pahentaa tilannetta entisestään. (4, s. 101-102)

4.3.2 Oireet

Keuhkorakkuloiden pienentyneen pinta-alan seurauksena hapen ja hiilidioksidin vaihto heikkenee, mikä johtaa veren happipitoisuuden pienenemiseen. Hapenpuute puolestaan aiheuttaa hengenahdistusta ja keuhkovaltimopaineen kohoamista, mikä voi johtaa keuhkosydänsairauden kehittymiseen. Vaikeimmissa tapauksissa seurauksina ovat hengityksen ja sydämen vajaatoiminta. Keuhkolaajentuma johtaa usein myös laihtumiseen, sillä hapenpuute vähentää liikuntaa, mikä puolestaan johtaa kudosten hitaaseen uudistumiseen. (4, s. 102)

4.4 Hoito

Kroonisen keuhkoputkentulehduksen ja keuhkolaajentuman oireet pahenevat yleensä vähitellen. Keuhkoahdaumatautia ei voida kokonaan parantaa, mutta sen oireita voidaan helpottaa lääkkeiden, happihoidon sekä fysikaalisten harjoitusten avulla. (4, s. 103)

5 Hengitysteiden sairauksien hoitoon käytetyt lääkeaineet

5.1 Kortikosteroidit

Astman taustalla oleva keuhkoputkien limakalvontulehdus muuttuu pitkittyessään krooniseksi. Kortikosteroidit ovat lisämunuaiskuoren tuottamia steroidihormoneja, jotka parantavat limakalvon tulehduksen ja vähentävät limakalvon supistumisherkkyyttä. Vaikutus tulee kuitenkin esiin vasta vuorokausien tai jopa viikkojen kuluttua käytön

aloittamisesta. Astman pahenemisen vaikeimmissa vaiheissa kortikosteroideja voidaan antaa suurempina annoksina joko tabletteina tai suonensisäisesti. (1, s. 32-33)

Kortikosteroidit vähentävät limakalvon tulehdusta vaikuttamalla tulehdussolujen kertymiseen ja toimintaan. Hengitysteiden soluissa ne kiinnittyvät glukokortikoidireseptoreihin. Muodostunut kompleksi sitoutuu tumaan ja hakeutuu geenin spesifiseen kohtaan, joka säätelee geenin kopioitumista. Näin värekarvasoluja vahingoittavia aineita tuottavien geenien kopiointi heikkenee, mikä puolestaan hidastaa astman kehittymistä. (2, s. 329)

Kortikosteroidit vaikuttavat limakalvoihin estämällä ärsykkeen aiheuttaman astma-kohtauksen jälkivaihetta (7). Jälkivaiheessa kohtauksen vuoksi vapautuneet välittäjäaineet stimuloivat esinofiilejä, jotka ovat immuunisoluja. Esinofiilien vapauttamat yhdisteet auttavat normaalisti tulehdusten parantamisessa, mutta astman ollessa kyseessä ne vahingoittavat keuhkokudosta pahentaen tulehdusta ja sen oireita entisestään. Kortikosteroidit inhiboivat esinofiilien sekä histamiinia tuottavien mast-solujen ja veressä olevien basofiilien toimintaa. (6; 7; 8; 9)

Astman vaikutuksesta uloshengitystiet eivät avaudu normaalisti vaan päinvastoin supistuvat. Terveillä ihmisillä vastaavan reaktion voi aiheuttaa jokin ärsyke, esimerkiksi tupakansavu. Kortikosteroidit rentouttavat hengityskanavia, mikä helpottaa uloshengitystä, sillä rentoutuneet keuhkoputket aukeavat, ja uloshengitettävä ilma poistuu paremmin. (6,10) Kortikosteroideilla lääkitään myös potilaita, jotka kärsivät runsaista keuhko-astma-kohtauksien pahentumisvaiheista (2, s. 361).

5.2 Keuhkoputkia laajentavat lääkkeet

Keuhkoputkia laajentavat lääkkeet laukaisevat ja estävät keuhkoputkien supistumisesta johtuvia astmaoireita. Ne vaikuttavat muun muassa laukaisemalla keuhkoputkea ympäröivän sileän lihaksen supistusta sekä vähentämällä limakalvonturvotusta ja limaneritystä. (1, s. 29)

5.2.1 β 2-sympatomimeetit

β 2-sympatomimeetit jaetaan lyhyt- ja pitkävaikutteisiin. Inhaloitavat β 2-sympatomimeetit vaikuttavat keuhkoputken sileään lihakseen. β -reseptori on

solukalvossa oleva entsyymi, adenylaattisyklaasi. Kun reseptoria stimuloidaan, se aiheuttaa syklisen adenosinimonofosfaatin muodostumista. Sen kertyminen soluun aiheuttaa sileän lihaksen rentoutumista sitomalla kalsiumia solukalvoon. (2, s. 333)

β 2-sympatomimeetit ovat tehokkaimpia suoraan keuhkoputkiin hengitettynä. Tällöin ne avaavat keuhkoputket nopeammin ja tehokkaammin kuin suun kautta otettuna sekä aiheuttavat vähemmän sivuvaikutuksia. Lääkettä voidaan käyttää myös ennaltaehkäisevästi hengittämällä sitä ennen tilannetta, joka tunnetusti aiheuttaa potilaalla astmaoireita. (1, s. 29-30)

Lyhytvaikutteiset keuhkoputken laajentajalääkkeet vaikuttavat nopeasti ja lievittävät oireita tehokkaasti 4-6 tunnin ajan. Astmaatikkojen tulisi pitää tällaisen lääkkeen annostelijaa aina mukanaan. (1, s. 29)

Pitkävaikutteiset β 2-sympatomimeetit ovat tärkeitä lääkkeitä kroonisen astman pitkäaikaishoidossa. Niiden vaikutus saattaa jatkua yli 12 tunnin ajan. Niitä käytetään lähinnä keskivaikean ja vaikean astman säännölliseen hoitoon, mikäli kortikoidilääkityksellä ei saada toivottua hoitotasoa ja lyhytvaikutteisia β 2-sympatomimeetteja tarvitaan useita kertoja päivässä. Kortikoidien käyttöä ei kuitenkaan tule lopettaa, vaan pitkäkestoisia β 2-sympatomimeetteja käytetään aina rinnakkain niiden kanssa. (1, s. 31)

Sympatomimeettien keuhkoputken lihaksistoa rentouttava vaikutus helpottaa myös keuhkohtaumataudin oireita. Tulehdus lievittyy lihaksiston rentoutumisen myötä. (4, s. 104) Antikolinergin ja β -sympatomimeetin yhdistelmälääkkeellä saadaan aikaan vielä tehokkaampi vaikutus (2, s. 360).

5.2.2 Antikolinergit

Inhaloitavilla antikolinergeilla on keuhkoputkia avaava vaikutus. Niillä voidaan osittain korvata β 2-sympatomimeerien käyttö, mikäli nämä aiheuttavat haittavaikutuksia. (11) Kolinergiset reseptorit aiheuttavat keuhkoputken lihaksiston supistumisen. Astmaa sairastavalla henkilöllä nämä reseptorit ovat ärtyneessä tilassa limakalvon tulehdusmuutosten takia, mikä aktivoi niitä ja johtaa keuhkoputken ahtautumiseen. Antikolinergit toimivat kolinergisissa reseptoreissa kilpailevina antagonisteina ja estävät näin niiden toimintaa. (2, s. 334)

6 Orion Oyj

Orion Oyj on vuonna 1917 perustettu lääkealan yritys. Perustajina toimivat kolme Medicalta lähtenyt farmaseuttia, joiden ura ei kielipoliittisista syistä edennyt ruotsinkielisten omistamassa tehtaassa. (12) Nykyiselle paikalleen Espoon Mankkaalle lääketehdas muutti vuonna 1962 (13). Kesällä 2006 lääketuotteiden tukkukauppa erkaantui omaksi yritykseksi, Oriola KDksi (14).

Orionin toiminta on jaettu viiteen erilliseen tulosityksikköön, joista jokainen vastaa omalta osaltaan tutkimuksesta, kehityksestä, valmistuksesta ja markkinoinnista (15, 16):

1. Alkuperälääkkeet vastaa patenttien suojaamien reseptilääkkeiden valmistuksesta. Orionin astmalääkkeiden valmistus kuuluu tämän tuotantoyksikön toimintaan.
2. Erityistuotteet vastaa patenteilla suojaamattomien reseptilääkkeiden sekä itsehoitolääkkeiden valmistuksesta.
3. Eläinlääkkeet puolestaan vastaa eläimille tarkoitetuista lääkevalmisteista.
4. Fermionin vastualueena on vaikuttavien aineiden valmistus Orionin omiin alkuperälääkkeisiin, joihinkin geneerisiin lääkkeisiin sekä lääkeaineiden valmistus ja myynti joillekin muille lääkealan yrityksille.
5. Orion Diagnostica vastaa diagnostisista tuotteista.

Orionin myynnistä suurin osa suuntautuu ulkomaille. Eurooppaan suuntautunut vienti kattaa 49 % liikevaihdosta, kotimaan myynnin osuus on 29 %, ja vienti muille alueille 21 %. (17)

Orion on myynnin perusteella selkeästi suurin lääkevalmistaja Suomen markkinoilla. Vuonna 2010 suurimman kilpailijan, Pfizerin, tukkumyynti oli noin 68 % Orionin myynnistä. (18)

Maailmanlaajuisessa vertailussa Orion on kuitenkin pieni toimija. Sen tukkumyynti vuonna 2010 oli 192 miljoonaa euroa, kun suurten kansainvälisten toimijoiden myynti lasketaan kymmenissä miljardeissa. (18, 22)

Lääkeala on vakaa ja taloudellisesti kasvava toimiala. Taloudelliset suhdanteet eivät vaikuta siihen merkittävästi. Alan myynti kasvaa vuosittain noin 4-7 %, ja kasvun uskotaan jatkuvan vielä ainakin joitakin vuosia. Suomessa lääkemarkkinat sen sijaan ovat laskussa, vuonna 2009 lääkkeiden tukkumyynti laski 0,5 %. (23)

6.1 Orionin tärkeimmät tuotteet

Orion on kehittänyt oman tutkimustoiminnan tuloksena kahdeksan alkuperäislääkettä. Alkuperälääkkeellä tarkoitetaan valmistetta, jonka vaikutus perustuu ainutlaatuiseen, patentoituun molekyylikeksintöön. Nämä muodostivat vuoden 2009 liikevaihdosta noin 42 %. (24) Ylivoimaisesti tärkeimmät tuotteet ovat Parkinsonin taudin hoitoon käytetyt kaksi lääkettä (19). Easyhaler-tuotteiden myynti puolestaan muodosti 3,2 % liikevaihdosta (18). Niitä myydään yli 25 maahan (25).

6.2 Orionin valmistamat astmalääkkeet

6.2.1 Easyhaler

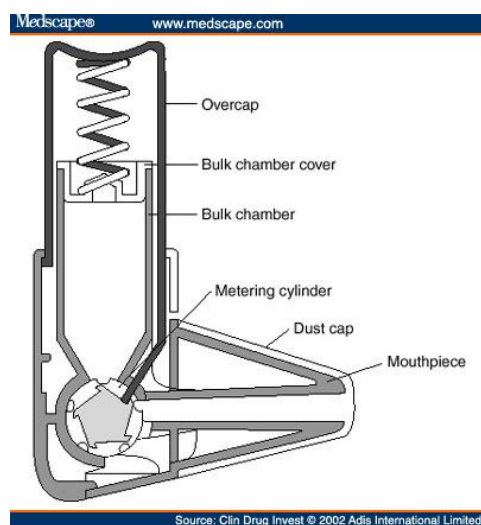
Inhalaattorin tehtävänä on saattaa vaikuttava lääkeaine alempiin hengitysteihin, jossa se vaikuttaa suoraan tautiprosessiin. Verenkiertoon lääkettä päätyy vain pieni määrä, ja näin saadaan toivottu vaikutus ilman merkittävää haittavaikutusta. Inhalaattorien käyttöä muidenkin kuin keuhkoihin vaikuttavien lääkkeiden annostelussa tutkitaan. (25) Easyhaler (kuva 3) on Orionin kehittämä ja patentoima inhalaattori eli jauheenhengityslaitte, jota käytetään Orionin valmistamien astmalääkkeiden annostelussa. Easyhaler on niin kutsuttu dry powder inhalator (DPI) eli kuivajauheinhalaattori. Se ei sisällä ponnekaasuja kuten useimmat astman hoidossa käytettävistä muista inhalaattoreista, joista käytetään nimitystä metered-dose inhalator (MDI). (25; 26)



Kuva 3. Easyhaler. (27)

Easyhaler-tuotteet olivat vuonna 2009 Orionin liikevaihdoltaan kolmanneksi suurin lääkevalmiste liikevaihdoltaan (19), joten puhutaan yrityksen kannalta merkittävästä tuotteesta. Niiden myynnissä on lisäksi tapahtunut huomattavaa kasvua viime vuosina (20). Astmalääkkeet ovat yleisesti ottaen myynnillisesti merkittävä tekijä lääketeollisuudelle, sillä vuonna 2010 kaksi kymmenestä myydyimmästä lääkevalmisteesta Suomessa kuului niihin (21).

Kuvassa 4 on esitetty Easyhalerin poikkileikkaus. Lääkejauhe on varastoitu säiliöön (bulk chamber). Kun inhalaattoria ravistellaan, niin mittasyylinteriin (metering cylinder) siirtyy yhden annoksen verran jauhetta. Sylinteri on mitoitettu juuri sopivan kokoiseksi halutulle annokselle. Kun tämän jälkeen inhalaattorin laukaisinta (overcap) painetaan, mittasyylinteri pyörittää ympäri ja siinä oleva lääkeannos siirtyy inhalaattorin suukappaleeseen (mouthpiece), josta se voidaan imeä pois.



Kuva 4. Easyhalerin rakenne. (28)

Puolueettomissa tutkimuksissa on todettu, että annoskoon vaihtelu on Easyhalerilla pienempää kuin vastaavia lääkeaineita sisältävillä MDI-inhalaattoreilla. Käyttäjän sisäänhengityksen voimakkuus ei vaikuta annoskoon yhtä paljon kuin MDI-laitteilla, mikä tekee Easyhalerista erityisesti lapsille sopivan tuotteen. Sen on myös havaittu miellyttävän potilaita MDI-inhalaattoria enemmän. Hinnaltaan Easyhaler on samaa luokkaa vastaavaa lääkettä sisältävien MDI-laitteiden kanssa, ja niinpä sen

markkinoiden voidaan ennustaa kasvavan DPI-laitteiden syrjäyttäessä perinteiset inhalaattorit. (29)

6.2.2 Inhalaattorituotteet

Tällä hetkellä markkinoilla on neljä erilaista Orionin kehittämää astmalääkevalmistetta. Näistä kahden vaikuttava aine on kortikosteroidi, yhden lyhytvaikutteinen β_2 -sympatomimeeri ja yhden pitkävaikutteinen β_2 -sympatomimeeri. Pitkävaikutteisista β_2 -sympatomimeeria sisältävää tuotetta voidaan käyttää myös keuhkohtaumataudin oireiden lievittämiseen. (25)

Orionilla on menossa tutkimusprojekti uusien yhdistelmälääkkeiden kehittämiseksi astman hoitoon. Budesonidi-formoteroli- ja flutikasoni-salmeteroli-yhdistelmävalmisteet sisältävät kahta vaikuttavaa ainetta. Lyhytkestoiset kortikosteroidit eli budesonidi ja flutikasoni hoitavat limakalvon tulehdusta, ja pitkävaikutteiset β_2 -sympatomimeerit puolestaan avaavat keuhkoputkia. (30) Vastaavat yhdistelmälääkkeet, joita on jo markkinoilla Orionin kilpailijoiden toimesta, ovat tällä hetkellä Suomen myydyimpiä astmalääkkeitä (21).

7 Menetelmän kehittäessä käytetyt tuotteet

Mittausmenetelmän kehittäessä käytettiin kahta eri inhalaattoria. Tuote A on jo markkinoilla oleva, testattu tuote, joka sisältää vaikuttavaa ainetta w noin 200 μg . Tuote B on vielä kehittämissä oleva valmiste. Se sisältää kahta eri vaikuttavaa ainetta, x:ää 500 μg ja y:tä 50 μg . w ja y ovat glukokortikodeja, x puolestaan pitkäkestoinen β_2 -sympatomimeetti.

Lisäksi Insinööritoimisto Aforen kehittämän putken paranneltua versiota testattiin tuotteella C. Kyseessä on tunnettu jo markkinoilla oleva tuote. Sen vaikuttava aine on z, jonka määrä annoksessa on noin 12 μg . Putken toimivuutta testattiin myös tekemällä nollanäytteitä tuotteen D menetelmällä ilman näytettä. Tuote D sisältää vaikuttavia aineita w ja z, ja sen analyysimenetelmä on erittäin herkkä epäpuhtauksille. Tuote on vasta kehittämissä. z on pitkäkestoinen β_2 -sympatomimeetti.

8 Kokeissa käytetyt laitteet

8.1 Analyysiputket

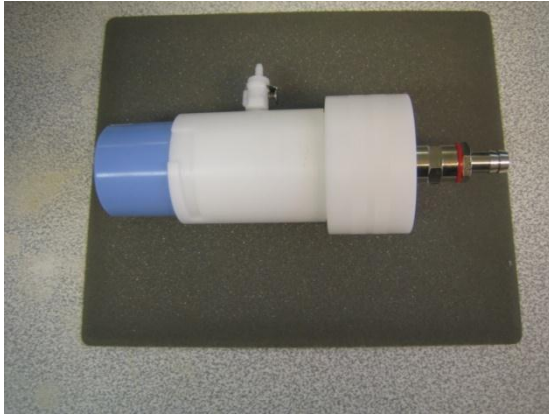
8.1.1 Lasiputki

Tähän saakka käytetty analyysiväline on lasinen, kaareva putki. Putki kiinnitetään toisessa päässä olevasta nokasta kumiletkun avulla imuventtiiliin. Toiseen päähän kiinnitetään sovitekappale, johon inhalaattori asetetaan ravistelun ja annoksen vapauttamisen jälkeen. Näyte liuotetaan irrottamalla sovitekappale, lisäämällä putkeen liuotinta ja ravistelemalla sitä käsin.

Putki on muodoltaan ja materiaaliltaan hankala käyttää. Kaarevan muodon vuoksi sitä ei saa pysymään pystyssä, joten sitä on pidettävä koko ajan joko kädessä tai metallikouralla statiivissa kiinni. Suuri koko ja hankala muoto estävät putken kiinnittämisen mekaanisiin ravistelijoihin. Tämän seurauksena sitä on ravisteltava käsin, mikä estää rinnakkaisten näytteiden tekemisen. Käsin ravistelu on työntekijän kannalta fyysisesti raskasta, joten tästäkään syystä putki ei ole kovin sopiva analyysiin. Käsin tehtävien ravistelujen toistettavuus on huonompi koneellisesti tehtyihin verrattuna, ja erityisesti eri henkilöiden tekemät ravistelut saattavat poiketa toisistaan. Lisäksi lasi on materiaalina huono särkyvyytensä takia.

8.1.2 Copleyn putki

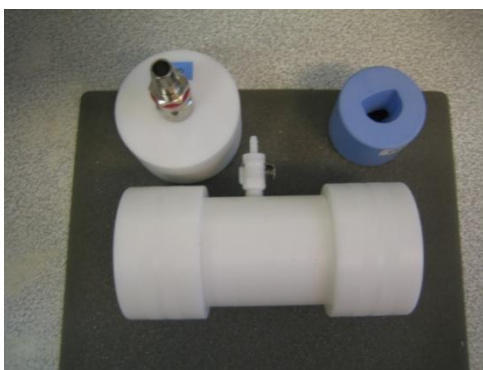
Analyysimenetelmää on kehitelty myös muovisia, englantilaisen Copley Scientific Limitedin valmistamia analyysiputkia (kuva 5) hyödyntäen. Putkiin asetetaan suodatinpaperi, johon näyte imetään. Putken saa suljettua molemmista päistä kansikappaleilla, joten putki pysyy pystyssä esimerkiksi pöydällä ja sen voi kiinnittää ravistelijoihin.



Kuva 5. Copleyn valmistama putki näytteenottovaiheessa.

Putkessa on kuitenkin joitakin heikkouksia. Imukappale, johon sekä suodatinpaperi että imuventtiilin letku kiinnitetään, on irrotettava putkesta ennen liuotusta. Suodatinpaperi irtaoo tällöin helposti putkesta, ja sitä on pidettävä paikallaan kappaletta irrotettaessa. Imukappaleen paikalle kiinnitetään vesitiivis kansikappale. Tämä hidastaa analyysin tekoa, ja suodatinpaperin käsittely sekä osien poistaminen saattaa vaikuttaa analyysituloksiin.

Myös sovitekappale, johon inhalaattori kiinnitetään, irrotetaan ennen liuotusta. Osa analysoitavasta jauheesta, testien mukaan noin 9 %, jää siihen kiinni. Tämä vaikuttaa luonnollisesti analyysitulokseen, joka olisi tarkoitus ottaa koko annoksesta. Sovitekappale korvataan samanlaisella kansikappaleella kuin imukappalekin (kuva 6).



Kuva 6. Copleyn valmistama putki liuotusvaiheessa.

Putken sivulla on jousella toimiva venttiili. Sitä käytetään paine-eron mittaamiseen analyysiolosuhteita määritettäessä. Kun venttiiliä avataan ja suljetaan analyysin sekä

putken pesun yhteydessä, venttiilin tiiviys heikkenee ja koko putken käyttöikä lyhenee. Kaiken lisäksi putki on erittäin kallis.

8.1.3 Aforen putki

Koska Copleyn valmistama putki sisältää useita heikkouksia, on päädytty kehittämään kokonaan uudenlaista analyysiputkea. Putken mallina on käytetty Copleyn tuotetta, minkä lisäksi on otettu huomioon viranomaisten antamat suositukset keräysputkelle. Kehittelyä on tehty yhteistyössä Aforen insinööritoimiston kanssa.

Turkulainen Afore Oy on perustettu 1995. Alun perin se oli tuotekehityspalveluja tarjoava insinööritoimisto, jonka ydinaluetta olivat erilaiset automaattioratkaisut. (31) Afore Consulting Oy irtautui erilliseksi yhtiöksi 2008 (32).



Kuva 7. Aforen kehittämä putki annoksenottovaiheessa, vieressä kumitulppa ja kansikappale.

Oleellisin parannus putkessa oli imukappaleen paranneltu versio (kuva 7). Kappaleen imunokkaa varten oli kehitetty vesitiivis kumitulppa, jonka avulla nokka suljettiin. Suodatinpaperin tiiviyttä parannettiin muotoilemalla kappale siten, että paperi kiinnitettiin kappaleeseen asetettavaan metalliristikoon kumisen o-renkaan avulla (kuva 8). Tämän ansiosta imukappaletta ei tarvinnut poistaa kesken analyysin.



Kuva 8. Aforen valmistaman putken imukappaleen sisäpuoli, o-rengas ja suodatinpaperi.

Putki sisälsi kuitenkin edelleen joitakin ongelmakohtia, joita oli myös Copleyn mallissa. Sovitekappale, joka oli yhteensopiva Copleyn putken kanssa, oli edelleen irrotettava ja korvattava kansikappaleella ennen liuotusta. Tällöin sovitteikappale oli huuhdeltava erikseen, ettei siihen jäänyttä osaa näytteestä menetettäisi. Tämä oli ylimääräinen työvaihe.

Toinen ongelma ensimmäisessä prototyypissä oli putken sisämitta. Suodatinpaperit olivat standardimittojen mukaisia, 47 millimetriä halkaisijaltaan. Imukappaleen halkaisija siinä kohtaa, johon paperi kiinnitettiin, oli kuitenkin hieman suurempi. Tällöin paperin ja kappaleen reunan väliin jäi pieni rako, josta osa inhalaattorin jauheesta saattoi kulkeutua venttiiliin imun aikana. Tämä luonnollisesti vaikutti analyysituloksiin. Putkesta päätettiin kehittää uudistettu versio analyysin luotettavuuden lisäämiseksi. Imukappaletta kavennettiin, jotta sisämitta olisi juuri oikea suodatinpaperille. Tällöin kaiken putkeen kulkeutuneen inhalaattorijauheen voitiin olettaa pysyvän mukana analyysissa.



Kuva 9. Aforen valmistama analyysiputki liuotusvaiheessa.

Sovitekappaleen haluttiin pysyvän mukana analyysissä. Tätä varten kehitettiin uusi kansikappale, joka peittää sovitekappaleen. Kansi kiinnitetään putkeen kierteiden avulla. Sen sisällä oli reunus, joka tuli sovitekappaleen suuaukon ympärille. Tällöin liuotin ei päässyt kulkeutumaan ravistelun aikana kansikappaleen ja sovitekappaleen väliin vaan pysyi putken sisällä. Sovitekappaleeseen jäänyt näyte saatiin huuhdeltua, ja näyte saatiin näin kokonaisuudessaan mukaan analyysiin. Kuvassa 9 on nähtävissä tiiviisti suljettu putki, josta ei ole irrotettu osia. Kappale suunniteltiin yhteensopivaksi Copleyn putkien kanssa, joten sitä voidaan jatkossa hyödyntää myös niillä tehtävissä analyyseissa.

8.2 Ravistelijat

8.2.1 Heidolph

Putkien ravistelussa käytettiin Heidolph Instrumentsin valmistamaa Reax 20/4-ravistelijaa (kuva 10). Ravistelijaan saa kerralla kiinni neljä näyteputkea. Se pyörii akselinsa ympäri, jolloin putket kääntyvät ylösalaisin. Tällöin liuotin huuhtelee putken pintoja, ja näyte liukenee. Laitteen nopeutta voi säädellä välillä 1-16 rpm. Saatavilla on myös laitteita, joihin saa useamman putken tai suuremman ravistelunopeuden.



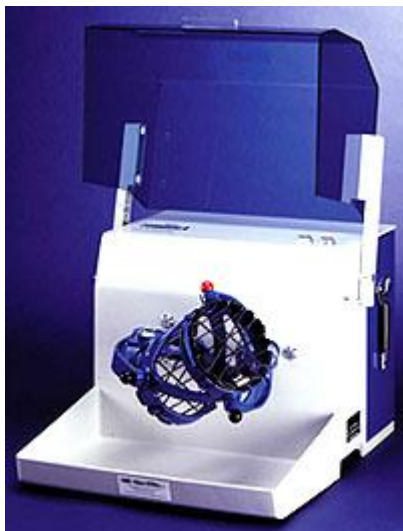
Kuva 10. Reax 20/4- ravistelijä, johon on kiinnitetty Aforen analyysiputki.

Putken kiinnitystappeja voi vaihdella. Käyttämällä erimittaisia tappeja laitteeseen voidaan kiinnittää hyvinkin eripituisia kappaleita. Kiinnitettävien analyysiputkien pituus voi vaihdella välillä 160-290 millimetriä (33), mikä mahdollistaa ravistelijalaitteen käytön niin Copleyn putkien kuin myös Aforen uusitun päällyskappaleen sisältävien putkien ravistelussa.

Näytteiden mekaaninen ravistelu vähentää työvoiman tarvetta analyysissa, sillä sen aikana analyysin tekijä voi tehdä jotakin muuta vaihetta, toisin kuin käsin ravisteltaessa. Useiden putkien yhtäaikainen ravistelu puolestaan mahdollistaa rinnakkaisnäytteiden tekemisen.

8.2.2 Turbula

Näytteiden ravistelua kokeiltiin myös Glenmills Inc:n valmistamalla Turbula-ravistelijalla. Putki kiinnitetään ravistelijaan kumisten kiinnityslenkkin avulla, ja ravistelijä sekoittaa sitä kahdeksikon muotoisessa kuviossa. Laitteessa on viisi eri nopeutta.



Kuva 11. Turbula-ravistelija. (34)

Vaikka Turbula havaittiin hyväksi analyysia tehtäessä, päätettiin sen käytöstä luopua, koska siihen saa kerralla kiinni vain yhden analyysiputken, mikä hankaloittaa rinnakkaisnäytteiden tekemistä. Inhalaattorista voitaisiin ottaa lisää näytteitä ravistelun aikana, mutta tämä ei nopeuttaisi juurikaan analyysia, sillä ne jouduttaisiin ravistelemaan yksitellen, mikä kuluttaisi moninkertaisesti aikaa verrattuna Heidolphin ravistelijalla tehtyyn, useita näytteitä sisältävään ravisteluun. Turbulan testaamista tulevaisuudessa muissa, huonommin liukenevien näytteiden analyyseissä kuitenkin suunniteltiin.

8.3 Kromatografi

Valmiit näytteet analysoitiin nestekromatografilla. Jokaisen valmisteon analyysille on luotu oma menetelmänsä. Ne poikkeavat toisistaan detektorin aallonpituuden, kolonnin mittojen, ajoliuoksen koostumuksen, virtausnopeuden, injektio-tilavuuden, retentioaikojen sekä ajoajan osalta. Kromatografi ilmoittaa vaikuttavan aineen pitoisuuden mikrogrammoina annoksessa.

9 Analyysimenetelmä

9.1 Virtausnopeuden määrittäminen

Inhalaattoreiden testaamisessa käytetään pumppua, jolla saadaan aikaan keuhkojen sisäänhengitystä vastaava imu. Ennen varsinaisen analyysin aloittamista virtausnopeus on säädettävä sopivaksi.

Virtausnopeuden asettamista varten on säädettävä pumpun aiheuttama paineen alenema sopivaksi. Tämä tapahtuu kiinnittämällä painemittari analyysiputkeen välikappaleen avulla, käynnistämällä pumppuun kytketty 2-tieventtiili ja säätelemällä venttiilin toimintaa. Haluttu paineen alenema on noin 4 kPa.

Kun haluttu paineen alenema on saavutettu, putkeen kiinnitetään virtausmittari, joka mittaa putken läpi kulkevaa tilavuusvirtausta. Virtauksen avulla saadaan laskettua analyysissä tarvittu imuaika, joka saadaan kaavalla $t = 240 I/v$, missä t on imuaika sekunteina ja v virtausnopeus litroina minuutissa. Näin saadaan mahdollisimman hyvin keuhkojen voimakkuutta vastaava imu.

9.2 Mittaus

Suodatinpaperi kiinnitetään analyysiputkeen. Paperissa on kaksi erilaista puolta, karhea ja sileä, ja on tärkeää, että se on putkessa oikein päin. Tutkittava aine kiinnittyy huomattavasti paremmin suodattimen karhealle pinnalle. Paperi joko kiinnittyy putkessa olevaan metalliristikoon, tai se kiinnitetään siihen kumisen o-renkaan avulla riippuen käytetystä putkimallista.

Tämän jälkeen putkeen kiinnitetään imu- ja sovitekappaleet. Imukappaleen päässä on metallinen putki. Siihen kiinnitetään kumiletku, joka yhdistää analyysiputken venttiiliin kautta pumppuun. Pumpun avulla aikaansaadaan mittauksessa tarvittava imu. Sovitekappale on muotoiltu inhalaattorin suukappaleen mittojen mukaan ja inhalaattori pystytään kiinnittämään siihen tiiviisti. Näin tutkittava annos saadaan imettyä putkeen kokonaan ilman hävikkiä.

Menetelmää kehiteltäessä käytettiin inhalaattoreista A ja B kolmea rinnakkaista, samasta valmistuserästä olevaa inhalaattoria. Inhalaattoreista otettiin annoksia alusta järjestyksessä eikä alusta, keskeltä ja lopusta, kuten laadunvalvonnan analyysissä.

Tutkittava inhalaattori taarataan vaa'alla. Inhalaattori punnitaan ennen jokaista annosta ja sen jälkeen, jotta mahdollinen liian pieni annos voidaan jättää huomioimatta tuloksissa. Tämän jälkeen sitä ravistellaan käsin kolme kertaa alhaalta ylös ja takaisin. Tällöin haluttu jauheannos siirtyy sylinteriannostelijaan inhalaattorin säiliöstä. Kun inhalaattorin laukaisinta painetaan, annos vapautuu imukanavaan. Tästä se imetään analyysiputkeen pumpun avulla. Kuvassa 12 on nähtävissä, kuinka inhalaattori ja venttiili kiinnittyvät Copleyn valmistamaan analyysiputkeen.



Kuva 12. Copleyn valmistama analyysiputki imuvaiheessa.

Kun näyte on putkessa, imuletku ja inhalaattori irrotetaan. Putki suljetaan imukappaleen puoleisesta päästä. Copleyn putken päätykappale vaihdetaan siten, että suodatinpaperi jää putkeen. Aforen putken imunokka puolestaan suljetaan kumisella korkilla. Tämän jälkeen liuotin pipetoidaan putkeen suutinkappaleen läpi, ja suutinkappaleen pää suljetaan. Copleyn putkella tämä tapahtuu irrottamalla suutinkappale ja korvaamalla se kansikappaleella, Aforen putkessa puolestaan kansikappale tulee sovitekappaleen päälle. Näin sekä näyte että liuotin ovat tiiviin putken sisällä, ja näyte on helppo liuottaa analyysia varten.

Suljettu analyysiputki kiinnitetään ravistelijaan. Putken ravistelu on välttämätöntä, sillä liuottimen määrä on pieni putken kokoon nähden. Näin putken sisäpintoihin kiinnittynyt jauhe saadaan liuotettua ravistelemalla putkea. Ravistelu parantaa myös suodatinpaperiin kiinnittyneen jauheen liukenemistä.

Ravistelun jälkeen putken kansikappale sekä Aforen putken ollessa kyseessä myös sovitekappale irrotetaan. Näin putkesta saadaan otettua pipetillä näyte analyysia varten. Näyte pipetoidaan lasiseen vialiin, joka suljetaan metallikorkilla. Näytteet analysoidaan nestekromatografilla.

Virallisessa analyysissä jokaisesta analysoitavasta inhalaattorista otetaan kymmenen annosta analyysia varten. Analyysioitavaksi otetaan inhalaattorin kolme ensimmäistä annosta, neljä keskimmäistä sekä kolme viimeistä annosta. Jos inhalaattori sisältäisi yhteensä sata lääkeannosta, analysoitaisiin näistä numerot 1-3, 49-52 ja 98-100. Mittasynterisiin kiinnitetystä numerokiekosta voidaan seurata, montako annosta inhalaattorista on otettu.

Analysoitavien annosten välissä olevat annokset imetään väliannosputkeen yksitellen, mutta niitä ei liuoteta. Näin varmistetaan, että inhalaattori toimii halutusti. Tällä hetkellä käytössä olevassa menetelmässä väliannosputki on samanlainen kuin varsinainen lasinen analyysiputki. Näytteiden välissä olevien annosten imeminen putkeen hidastaa analyysia huomattavasti. Lisäksi jatkuva inhalaattorin ravistelu ja laukaiseminen käsin on fyysisesti raskasta työntekijän kannalta sekä vaatii huomattavasti työvoimaa.

10 Työturvallisuus

10.1 Tutkittavien näytteiden aiheuttamat riskit

Koska tutkittavat yhdisteet olivat astman hoitoon sisäisesti tarkoitettuja jauheita, niiden käyttöön ei liity huomattavia terveyshaittoja. Jauheiden on kuitenkin todettu ärsyttävän ihoa, ja kädet tulee suojata hyvin niitä käsiteltäessä. Ihon toistuva altistuminen inhalaattorien lääkejauheille saattaa aiheuttaa allergisia reaktioita. Inhalaattorista saattaa vuotaa jauhetta, ja pieniä määriä saattaa vapautua inhalaattorin laukaisun yhteydessä, jolloin se ei ole vielä kytkettynä imuputkeen.

Vaikka inhalaattorin sisältämä jauhe on tarkoitettu sisään hengitettäväksi, suuren määrän joutuminen hengitysteihin saattaa aiheuttaa terveydellisiä haittoja. Myös inhalaattorin jauheiden joutumista silmiin tulee välttää. Tämän vuoksi näytteet on valmistettava vetokaapissa, ja on syytä käyttää suojalaseja.

10.2 Liuottimet

Tuotteiden A, B ja C sisältämien jauheiden liuottamisessa käytettiin asetonitriliä. Se on haitallista iholle ja erityisesti silmiin joutuessaan, joten näytteitä valmisteltaessa oli suojauduttava asianmukaisesti. Asetonitrili on herkästi haihtuvaa. Se kuitenkin hajoaa todella hitaasti haihduttuaan, joten liuotin on lisättävä näytteisiin vetokaapissa sisään hengityksen välttämiseksi. Liuotinta valmistettaessa asetonitriliin sekoitettiin vettä, mikä vähentää sen aiheuttamia terveysvaikutuksia. Koska asetonitrili on herkästi syttyvää, liuotinpullot tulee säilyttää erillään mahdollisesti kuumenevista laitteista. (35) Näytteen D liuottimessa käytettiin metanolia. Sitä käytettäessä on huomioitava samat turvallisuustekijät, mitkä koskevat asetonitriliä. (36)

Tutkittavat lääkeaineet on todettu haitallisiksi ympäristön kannalta. Erityisesti tutkittavan aineen C on todettu olevan haitallista vesieliöille. Tämän takia analyyseissa syntyneet kemikaalijätteet on kerättävä talteen ja toimitettava asianmukaisesti hävitettäväksi. (37)

11 Mittausmenetelmän kehittäminen

11.1 Näytteiden määrä

Analysoitavien rinnakkaisnäytteiden määräksi valittiin noin kolmekymmentä. Todettiin, että näin isossa otoksessa yksittäisen näytteen poikkeama ei vaikuta tuloksiin merkittävästi. Rinnakkaisnäytteitä tarvittiin paljon, sillä kahden näytteen pitoisuusero voi olla jopa kymmeniä prosentteja, vaikka molemmat olisivat hyväksyttävien rajojen sisällä. Näytteiden valmistaminen sekoittajan avulla oli nopeaa, joten näytemäärää ei jouduttu rajoittamaan ajankäytön takia. Lisäksi näytteet olivat halpoja, sillä aiemmista analyyseistä jääneitä, ylimääräisiä inhalaattoreita oli runsaasti eivätkä analyysiin tarvittavat liuottimetkaan muodosta merkittävää kuluerää. Näytteiden määrää rajoitti lähinnä kromatografin kapasiteetti.

Menetelmän testaamiselle olisi voitu laatia myös tarkempi suunnitelma, esimerkiksi 2^N-koesuunnitelma. Tälle ei kuitenkaan ollut tarvetta, sillä jo ennakkoon oltiin melko varmoja siitä, mihin suuntaan tulokset kehittyvät ravistelunopeuden kasvaessa. Myöskään optimaalisen ravisteluajan selvittäminen ei ollut tarpeellista. Ravistelun aikana analyysejä tekevä henkilö voi tehdä muita työhön liittyviä vaiheita. Analyysi ei

käytännössä nopeudu, jos ravistelu-aika on niin lyhyt, ettei sen aikana voida suorittaa muita vaiheita. Lisäksi ravistelun keston ja nopeuden välillä ei uskottu olevan yhdysvaikutusta.

11.2 Pesun selvitys

Putkia käsin pestäessä ja niitä kuivattaessa kuluu pesuun huomattavasti aikaa. Tämä hidastaa analyysia merkittävästi, erityisesti jos ravistelu-aika on niin lyhyt, ettei pesua ehditä suorittaa seuraavan ravistelun aikana. Tätä tutkimusta tehtäessä käytössä oli vain kolme Copleyn valmistamaa putkea sekä yksi Aforen putki, joten pesuja ja analyyseja ei voitu tehdä rinnakkain, vaan mahdollinen pesu oli tehtävä aina ennen uutta analyysia. Joka näytteen välissä toistuvasta pesuvaiheesta oli siis syytä pyrkiä eroon tutkimuksen nopeuttamiseksi.

Analyysiputken näytteiden välissä tapahtuvan pesun vaikutus tuloksiin selvitettiin tekemällä tuotteella A näytesarja, jossa putket pestiin vain joka toisen näytteidenoton jälkeen. Näytteiden ravistelunopeus oli 9 rpm ja ravistelu-aika 15 min. Osa näytteistä liuotettiin Turbulaan ravistelijassa. Lisäksi otettiin nollanäytteitä pesemättömistä putkista sekä näytteitä putken pesemättömästä sovitekappaleesta.

11.3 Ravistelunopeuden vaikutuksen selvitys

Heidolphin ravistelijan nopeutta voidaan säätää portaattomasti. Oletuksena oli, että mitä nopeammin ravistelijä pyörii, sitä paremmin tutkittavat aineet liukenevat, sillä sitä paremmin liuotin huuhtoo putken sisäpintoja ja suodatinta. Koska ei kuitenkaan ollut tiedossa, miten liuotin liikkuu putken pintoja pitkin ravistelun aikana, oli nopeuden vaikutus testattava. Oli myös epäselvää, kestääkö suodatinpaperi voimakasta ravistelua.

Ravistelunopeuden vaikutusta mittauksen onnistumiseen selvitettiin tekemällä rinnakkaisia näytteitä tuotteesta A Heidolphin ravistelijalla nopeuksilla 3, 12 ja 15 rpm. Ravistelu-aika oli kaikille näytteille 15 min.

11.4 Ravisteluajan vaikutuksen selvitys

Ravistelu-aika on oleellinen tekijä analyysia suunniteltaessa. Pidempi ravistelu-aika liuottaa näytettä paremmin putken sisäpinnoista ja suodatinpaperista. Analyysin kesto riippuu kuitenkin merkittävästi ravisteluajasta. Tästä syystä ravistelu-aika tulisi

optimoida siten, että se liuottaa näytteen mahdollisimman hyvin mutta ei kestä kauemmin kuin on välttämätöntä.

Ravisteluaajan vaikutus näytteen onnistumiseen testattiin tekemällä Heidolphin ravistelijalla näytesarjoja kahden, viiden, kymmenen ja viidentoista minuutin ravisteluaajoilla 15 rpm nopeudella. Näytteinä käytettiin tuotteita A ja B.

11.5 Uusitun Aforen putken testaus

Aforen putkesta saatiin käyttöön paranneltu versio. Parannuksena vanhaan putkeen verrattuna oli kapeampi eli oikean kokoinen halkaisija suodatinpesälle, jolloin ohivirtauksen mahdollisuus poistuu. Toinen muutos oli kansikappale, jonka avulla sovitekappale saatiin suljettua putken sisään liuotuksen ajaksi. Tämän seurauksena mitään osia ei tarvinnut poistaa kesken analyysiä.

Putkea testattiin analysoimalla tuotteiden A, B ja C näytteitä. Näytteiden ravistelunopeus oli 15 rpm ja ravistelun kesto 5 minuuttia. Lisäksi tehtiin nollanäytteitä tuotteen D menetelmällä, jotta nähtäisiin, soveltuuko putki tälle menetelmälle. Lisäksi suodatinpaperin soveltumista menetelmille A ja C testattiin liuottamalla puhdasta suodatinpaperia menetelmän liuottimessa dekanterilasissa ja laittamalla tästä otettu näyte kromatografianalyysiin. Sovitekappaletta puolestaan testattiin liuottamalla sitä menetelmän A liuottimessa ja ottamalla tästä näyte.

12 Tulokset

12.1 Hyväksyttävien tulosten rajat

Vaikuttavan aineen pitoisuudelle inhalaattorin annoksessa sallitaan melko suuri vaihtelu. Tuotteesta analysoitujen kymmenen näytteen keskiarvon tulee olla tietyn prosentuaalisen poikkeaman sisällä tuotteelle ilmoitetusta pitoisuudesta. Poikkeaman suuruus vaihtelee tuotteittain ja määräytyy viranomaisohjeiden mukaan. Tuotteelle on saatava myyntilupa, johon kuuluvat muun muassa tuotteen laatuvaatimukset. Annoksen tulos ja keskimääräinen vaihteluväli kuuluvat näihin vaatimuksiin. Lisäksi kaikkien kymmenen näytteen pitoisuuden tulee olla tietyn prosenttiluvun sisällä niiden keskiarvosta, ja yhdeksän näytteen kymmenestä tulee olla toisen, pienemmän prosenttiluvun sisällä keskiarvosta. (38)

12.2 Mitatut tulokset

Taulukko 1. Analyysiputkien pesun vaikutus tuloksiin

Putki	Tulos [μg]	Ilmoitettu arvo [μg]	Hajonta [μg]	Näytemäärä
Copley pesty	187,15	220	11,07	12
Copley pesemätön	190,55	220	13,76	8
Nollanäyte	3,54	0	0,80	5
Sovite	19,66	0	7,56	8

Taulukko 2. Ravistelunopeuden vaikutus tuloksiin

Ravistelunopeus [rpm]	Tulos [μg]	Ilmoitettu arvo [μg]	Hajonta [μg]	Näytteiden määrä
3	173,26	220	17,38	11
12	211,58	220	17,00	12
15	209,43	220	11,52	13

Taulukko 3. Ravisteluajan vaikutus tuloksiin

Näyte	Ravistelu aika [min]	Tulos [μg]	Ilmoitetut arvot [μg]	Hajonnat [μg]	Näytemäärä
A	15	209,43	220	17,00	13
A	10	204,91	220	19,95	28
A	5	219,31	220	18,59	26
A	2	204,94	220	32,12	19
B	5	43,77/468,04	43/463,5	3,13/29,37	30
B	2	42,39/455,91	43/463,5	5,27/37,68	29

Taulukko 4. Aforen valmistaman putken uudella versiolla tehtyjen mittausten tuloksia

Näyte	Tulos [μg]	Ilmoitetut arvot [μg]	Hajonnat [μg]	Kappalemäärä
A	215,99	220	12,23	34
A nollanäyte	0,0	0	0	1
A sovitekappale	1,63	0	0,10	2
A suodattimen nollanäyte	0,0	0	0	2
B	42,39/466,62	43/463,5	2,28/16,53	5
B nollanäyte	0/0	0/0	0/0	4
C	11,79	12	0,82	5
C nollanäyte	0,0	0	0	4
C suodattimen nollanäyte	0,0	0	0	1
D nollanäyte	0,0	0	0	4

13 Johtopäätökset

13.1 Pesun vaikutus tuloksiin

Käytetyistä pesemättömistä putkista tehtiin nollanäytteitä. Putki koottiin normaalisti ja siihen lisättiin liuotin. Tämän jälkeen putkea ravisteltiin ja siitä otettiin näyte kromatografianalyysia varten. Näytteiden pitoisuudet jäivät niin pieniksi, ettei niillä voida katsoa olevan vaikutusta mittaustuloksiin. Tämä tukee jo aiemmin tehtyä havaintoa siitä, ettei putkien peseminen saman tuotteen näytteiden välillä ole välttämätöntä.

Sovitekappaleista otetut nollanäytteet sen sijaan antoivat huomattavasti suurempia tuloksia. Niiden keskiarvo, 19,66 μg , on noin 9 % saman näyte-erän virallisesta pitoisuudesta eli sovitekappaleeseen mahdollisesti jäänyt, liukenematon jauhe saattaa vaikuttaa tuloksiin merkittävästi.

Todettiin että Copleyn putken peseminen sovitekappaletta lukuun ottamatta ei ole tarpeellista näytteiden välissä, jolloin analyysien tekemistä voidaan nopeuttaa merkittävästi. Pesun jälkeen putket jouduttiin kuivaamaan ilmapuhalluksella. Pesu ja kuivaus vaativat enemmän aikaa kuin itse näytteen valmisteleminen. Vaihtoehtoisesti olisi hankittava suuri määrä putkia, jotta samaa putkea ei tarvitsisi käyttää kuin kerran analyysija tehtäessä ja ne kaikki voitaisiin pestä lopuksi. Tutkittavien näytteiden pitoisuudet ovat käytännössä yhtä suuria, joten pesemättömyyden eli pitäisikään aiheuttaa merkittävää virhettä. Sovitekappaleet päätettiin pestä ja kuivata jokaisen näytteen välissä.

Tutkittujen näytteiden pitoisuusarvot olivat välillä 162,72–207,28 µg. Ne ovat huomattavasti pienempiä kuin aiemmin mitatut näytteet, joiden keskiarvo oli 220 µg. Näytteiden pienet pitoisuudet johtuvat luultavimmin hitaasta ravistelusta. Näytteet ravisteltiin pyörimisnopeudella 9 rpm, mutta myöhemmin todettiin suuremman nopeuden liuottavan näytteet paremmin. Lisäksi osa tutkituista inhalaattorin annoksista jäi massaltaan hieman pieniksi, mikä johtui luultavasti näytteet valmistaneen henkilön kokemattomuudesta.

Pestyjen näytteiden suhteellinen hajonta oli 5,9 % ja pesemättömien näytteiden 7,2 %. Putkien pesu näytteiden välissä ei siis vaikuta oleellisesti tulosten hajontaan, sillä inhalaattorin näytteiden välille sallitaan huomattavasti suurempi hajonta. Putkien pesu jokaisen näytteen välillä voidaan tämänkin havainnon perusteella jättää tekemättä. Vaikka hajonta on hieman suurempi pesemättömillä näytteillä, on se kuitenkin selvästi sallittujen rajojen sisäpuolella.

13.2 Ravistelunopeuden vaikutus

Tuloksista voidaan todeta, että näytteiden liuottamisessa voidaan käyttää suurinta mahdollista kierrosnopeutta. Nopeuksilla 12 rpm ja 15 rpm saadut tulokset ovat käytännössä yhtä hyviä, ja kaikki nopeudella 15 rpm tehdyt näytteet saivat raja-arvojen mukaan hyväksytyn pitoisuuden. Ravistelunopeuden 15 rpm voidaan katsoa olevan analyysiin sopiva.

Ravistelunopeudella 3 rpm valmistelluista näytteistä kaksi sai raja-arvon alittavan pitoisuuden, mikä saattaa johtua liian vähäisestä liukenemisestä ravistelun aikana.

Lisäksi saadut pitoisuudet olivat huomattavasti pienempiä kuin saman tuote-erän hyväksytyssä analyysissä. Täten 3 rpm:n nopeutta ei voida pitää riittävänä ravistelulle. Kierrosnopeuksilla 3 rpm ja 15 rpm tehtyjä näytteitä sentrifugoitiin suodattimen kestävyuden arvioimiseksi. Sentrifugoiduissa näytteissä ei ollut havaittavissa nukkaa, joten voidaan olettaa, ettei suodattimesta irtoa mitään ravistelun aikana. Kromatografian mittaustuloksiinkaan sentrifugointi ei vaikuta käytännössä lainkaan, ero sentrifugoitujen ja muiden näytteiden välillä oli noin 0,3 %. Suodattimen katsottiin soveltuvan hyvin analyysiin, eikä se vaadi minkäänlaista esikäsittelyä.

Kierrosnopeudella 15 rpm valmistettujen näytteiden keskihajonta oli 17,01 µg, mikä on noin 8,1 % näytteiden keskiarvosta. Hajonta ei ole liian suuri, joten analyysia voidaan pitää toistettavana. Tutkittujen näytteiden massat vaihtelevat välillä 8,12–9,53 mg, joten se aiheuttaa jonkin verran hajontaa. Inhalaattorin sisältämä jauhe on kuitenkin suurimmaksi osaksi muita aineita kuin tutkittavaa lääkeainetta, joten näytteiden massojen väliset erot eivät välttämättä ole samassa suhteessa kuin niistä mitatut pitoisuuserot. Jauheen eri ainesosat eivät välttämättä jakaannu tasan eri annosten välillä, mikä vaikuttaa poikkeamiin pitoisuuksissa annoskokojen eroja enemmän.

Punnituksissa käytetty vaaka ei myöskään ole riittävän tarkka, jotta sillä voitaisiin luotettavasti punnita alle milligramman suuruisia eroja. Tällöin punnitustulosten huomioon ottaminen tuloksia tarkasteltaessa toisi vain lisähajontaa. Vaaka on kuitenkin riittävän luotettava, jotta kokonaan vapautumatta jäänyt annos voidaan havaita annospainon perusteella. Jos käytössä olisi ollut tarkempi vaaka, olisi annosten massojen välinen ero voitu ottaa huomioon tuloksia tarkasteltaessa.

Kierrosnopeudella 12 rpm valmistettujen näytteiden keskihajonta oli 5,4 % eli jonkin verran pienempi kuin kierrosnopeudella 15 rpm valmistetuilla näytteillä. Analysoitujen näytteiden määrä on kuitenkin liian pieni, jotta tuloksista voitaisiin tehdä luotettavia johtopäätöksiä menetelmän paremmuudesta. Lisäksi tutkittaville näytteille sallitaan huomattavasti suurempi hajonta, joten alle kolmen prosenttiyksikön ero ei ole merkittävä tekijä nopeutta valittaessa. Koska ravistelulle pyrittiin löytämään parametrit, jotka sopisivat mahdollisimman monen tuotteen analyysiin, päätettiin jatkossa käyttää suurinta mahdollista ravistelunopeutta eli 15 rpm.

13.3 Ravisteluajan vaikutus

Tuotteella A tehtyjen analyysien tulosten perusteella todettiin, että viisi minuuttia on sopiva ravistelu-aika. Kaksi minuuttia kestäväällä ravistelulla valmistettujen näytteiden pitoisuuksien tulokset jäävät pienemmiksi. Lisäksi ravistelun lyhentäminen alle viiteen minuuttiin ei enää ratkaisevasti nopeuta analyysien tekemistä. Viiden minuutin ravistelun aikana ehditään valmistella seuraavat näytteet, mutta lyhyemmän ravistelun aikana tähän ei välttämättä kyetä.

Viiden minuutin ravistelulla tehdyistä näytteistä kaksi antoi raja-arvoa suuremman mittaustuloksen. Kummankaan poikkeama ei kuitenkaan ylittänyt sitä rajaa, jonka sisällä kaikkien näytteiden pitää olla niiden keskiarvosta, ja vain toinen erosi keskiarvosta yhdelle näytteelle sallittavan poikkeaman verran, eli annosten pitoisuudet olivat täysin hyväksyttäviä. Tämän perusteella analyysin voidaan katsoa onnistuneen ja menetelmää pitää hyvänä. Keskimääräistä suuremmat annokset eivät välttämättä kerro menetelmän aiheuttamasta virheestä, vaan kyseessä on jauheinhalaattoreille ominainen ja sallittu melko suuri annoskoon vaihtelu. Liian suuren tuloksen antaneiden annosten massa ei kuitenkaan poikennut muista näytteistä, joten annoskoko ei sinänsä selitä poikkeavia tuloksia.

Menetelmän systemaattiset virheet vääristävät tuloksia pikemminkin alas- kuin ylöspäin tutkittavan annoksen epätäydellisen huuhtoutumisen seurauksena. Liuottimen tilavuuden pieneneminen haihtumisen seurauksena voisi vääristää tuloksia ylöspäin, mutta koska ravistelu tehtiin suljetussa putkessa, ei sitä ole voinut tapahtua häiritsevässä määrin.

Kahden minuutin ravisteluajalla valmistetulle näytteelle numero 311 mitattiin pitoisuudeksi 99,5 µg. Tulos poikkesi huomattavasti, enemmän kuin yhdellekään näytteelle on sallittua, muista näytteistä. Näytteen massa, 8,58 mg, ei kuitenkaan ollut oleellisesti poikkeava. Syynä huomattavan pieneen pitoisuuteen on luultavasti näytteen huono liukeneminen putkesta. Jos lääkeaine jakautuu näin epätasaisesti inhalaattorin eri annosten välillä, ei koko laitetta voida pitää toimivana. Pidemmällä ravisteluajoilla ei kuitenkaan havaittu mitään tähän viittaavaa, joten inhalaattorissa tai sen sisältämässä lääkejauheessa ei voida katsoa olevan vikaa. On mahdollista, että liian lyhyt

ravistelu aika on johtanut näytteen heikkoon liukenemiseen, mikäli jauhe on tarttunut putkeen normaalista poikkeavasti kohtiin, joita liuotin huuhtelee huonommin.

Näytteiden keskihajonta oli 18,59 mg. Tämä on noin 8,5 % näytteiden keskiarvosta. Hajonta ei ole liian suuri ottaen huomioon, kuinka suuri vaihteluväli hyväksytyillä näytteillä on. Kahden minuutin ravistelulla valmistettujen näytteiden suhteellinen hajonta oli 15,7 %. Hajonnan kasvaminen ravisteluajan lyhentyessä heikentää analyysin luotettavuutta. Tämän perusteella todettiin, että viisi minuuttia on riittävä kesto ravistelulle.

Myös tuotteen B näytteille tehtyjen analyysien tulokset saavat molempia vaikuttavia aineita analysoitaessa viiden minuutin ravistelulla paremmat tulokset kahden minuutin ravisteluun verrattuna. Tuloksia verrattiin aiempiin, hyväksytyillä menetelmällä saatuihin tuloksiin, ja viiden minuutin ravisteluajalla valmistettujen näytteiden tulokset olivat lähempänä niitä. Viiden minuutin ravistelulla valmistetuilla näytteillä molempien aineiden pitoisuuksien keskihajonta on lisäksi pienempi. Täten voidaan todeta viiden minuutin ravistelun olevan sopiva myös tuotteelle B.

13.4 Uusittu Aforen putki

Tuloksista voidaan todeta, että Aforen suunnitteleman putken uusi versio soveltuu varsin hyvin tuotteen A testaamiseen. Saadut tulokset ovat lähellä aiempia, hyväksytyillä menetelmillä tutkittujen, samoista valmistuseristä otettujen näytteiden tuloksia. Tulos oli myös hyvin lähellä Copleyn valmistamalla putkella mitattuja tuloksia, joten putkia voitaisiin käyttää rinnakkain analyysissä.

Kaikille 34 näytteelle mitatut pitoisuudet ovat hyväksyttävien raja-arvojen sisällä. Tulosten välinen hajonta oli myös melko pientä, alle 6 %. Putken voitiin siis katsoa soveltuvan hyvin tuotteen analyysiin.

Myös tuotteille B ja C tehdyt analyysit antoivat hyviä tuloksia. Mitatut pitoisuudet olivat lähellä aiemmin mitattuja arvoja. Tulosten hajonta jäi melko pieneksi, alle kymmeneen prosenttiin molempien tuotteiden näytteillä. Tutkittuja näytteitä oli kuitenkin vain viisi kappaletta molemmista tuotteista. Määrä on niin pieni, ettei tuloksia voida vielä pitää luotettavina. Niistä saatujen tulosten perusteella voidaan kuitenkin olettaa putken

soveltuvan myös näiden aineiden analyysiin, joten lisää näytteitä tulisi tehdä menetelmän luotettavuuden varmistamiseksi. Jokin analyysiputkesta irtoava aine voi aiheuttaa piikkejä kromatografiajoiden kuvaajiin, ja Aforen putkella tehtiinkin nollanäytteitä eri menetelmillä, jotta varmistuisi, ettei putki aiheuta tuloksia vääristäviä piikkejä.

14 Mahdolliset virhelähteet

14.1 Inhalaattori

Inhalaattorin annosteleman näytemäärän tulisi olla joka kerta samansuuruinen, jotta näytteet olisivat keskenään mahdollisimman vertailukelpoisia. Näytteiden massojen välillä on kuitenkin pientä hajontaa, massojen suhteellinen keskipoikkeama on noin 4 %. Erot eivät kuitenkaan käytännössä vaikuta mittaustuloksiin, sillä vain pieni osa inhalaattorin sisältämästä jauheesta on tutkittavaa, vaikuttavaa ainetta. Esimerkiksi näytteen A annoksen massa vaihtelee välillä 8-9 mg, kun tutkittavaa ainetta on annoksessa noin 0,2 mg. Inhalaattori punnittiin joka näytteen jälkeen, jotta mahdollinen aivan liian pieni annos voitaisiin jättää huomioimatta tuloksissa.

Käsin tehty ravistelu saattaa vaikuttaa inhalaattorin annoskokoon. Vaikka ravistelua olisi harjoiteltu, on sen toistaminen täysin identtisesti käsin joka kerta vaikeaa. Tämä ei kuitenkaan vaikuta tulosten onnistumiseen, kuten edellä todettiin. Jos ravistelut tehtäisiin koneellisesti, olisi niiden välillä luultavasti vähemmän eroa. Käyttäjä kuitenkin ravistelee inhalaattoria käsin ennen lääkeaineen ottoa, ja inhalaattorin testaamisessa tulisi jäljitellä mahdollisimman tarkasti tätä tilannetta.

Myöskään inhalaattorin mekanismi ei välttämättä toimi joka kerta täysin samalla tavalla. Jos laite vioittuu, sylinteriannostelija ei välttämättä pyörähdä joka laukaisulla samalla lailla. Tämä saattaa vaikuttaa huomattavasti annoskokoon.

Laukaisumekanismin liiallisen jäykkyyden seurauksena osa lääkeannoksesta saattaa poistua inhalaattorista jo ennen imua. Laukaisinta painettaessa osa jauheesta tulee ulos, ja koska inhalaattori ei vielä ole kiinni analyysiputkessa, tämä osa jää pois analysoitavasta annoksesta. Vapautuneen annoksen massa on kuitenkin normaali, joten inhalaattoria punnittaessa liian aikaisin ulos tullutta lääkeainetta ei voida havaita.

Lisäksi on mahdotonta selvittää, kuinka suuri osa annoksesta on poistunut inhalaattorista analyysiputken ulkopuolelle.

Laukaisun yhteydessä inhalaattorista ennenaikaisesti poistunut jauhe on kuitenkin helppo havaita silmämääräisesti. Jos näin tapahtui, se kirjattiin näytteen tietoihin. Näistä poikkeavia tuloksia antaneet jätettiin huomioimatta tuloksia käsiteltäessä, joten tulokset eivät luultavasti vääristyneet liian aikaisen jauheen ulostulon vuoksi. Voisi olla hyödyllistä selvittää, kuinka suuri keskimäärin on ilman imua ulos tulleen jauheen määrä.

Yksittäisen inhalaattorin vaikutusta tuloksiin vähennettiin käyttämällä kaikissa analyyseissä kolmea samasta valmistuserästä olevaa inhalaattoria. Mahdollinen, koko erään vaikuttava valmistusvirhe olisi näin voinut vääristää tuloksia. Käytetyt inhalaattorierät oli kuitenkin aiemmissa mittauksissa hyväksytty, joten systemaattista valmistusvirhettä ei ollut.

14.2 Liuokset

Työssä käytettävät liuottimet sekä kromatografien ajoliuokset valmistettiin hyväksytyn menetelmän mukaan. Molemmissa käytettiin HPLC-laatuisia kemikaaleja, joten ne eivät luultavasti aiheuta virhettä.

Veden puhtautta valvotaan säännöllisesti. Jos veden laatu ei ole riittävän hyvä, vesierä hävitetään. Lisäksi puhdistuslaitteisto asetetaan käyttökieltoon, kunnes tarvittavat korjaustoimet laadun parantamiseksi on tehty, ja parantunut laatu on todettu analyyseilla. Liuoksia tehtiin vain pieni määrä kerrallaan, joten valmistuksessa sattunut virhe ei vaikuttaisi kuin pieneen osaan näytteistä. Toisaalta taas tämä saattaisi aiheuttaa vaihtelua eri liuoseriä käytettäessä.

Käytössä oleva vedenpuhdistuslaitteisto koostuu esipuhdistusyksiköstä sekä jatkopuhdistusyksiköstä. Esipuhdistusyksikkö, Elga PureLab Prima, poistaa vedestä yli 98 % epäorgaanisista aineista käänteisosmoosilla. (39) Osmoosi on ilmiö, jossa neste pyrkii siirtymään orgaanisen, puoliläpäisevän kalvon läpi siten, että jonkin aineen pitoisuus nesteessä olisi sama kalvon molemmilla puolilla. Nestettä siirtyy siis laimeammasta pitoisuudesta väkevämpään pitoisuuseron tasapainottamiseksi. Näiden

nesteidен paine-eroa kutsutaan osmoottiseksi paineeksi. Kun liuokseen, jossa on voimakkaampi pitoisuus, kohdistetaan ulkopuolista painetta, tapahtuu käänteisosmoosi. Tällöin puhdasta nestettä siirtyy kalvon läpi korkeammasta pitoisuudesta matalampaan pitoisuuteen. Epäorgaaniset epäpuhtaudet eivät läpäise kalvoa, ja niitä sisältävä neste jää korkeamman pitoisuuden puolelle. (40)

Jatkopuhdistusyksikkö, Elga Purelab Maxima, koostuu kahdesta peräkkäisestä puhdistuspatruunasta. Tällöin ensimmäisen patruunan mahdollisesti läpäisseet epäpuhtaudet saadaan suodatettua pois toisen patruunan avulla. Kahden patruunan ansiosta puhdistusprosessi jatkuu, vaikka ensimmäisen patruunan puhdistuskyky olisi ylittynyt liiallisen käytön seurauksena. (41 s. 3)

Puhdistus patruunoissa tapahtuu ioninvaihtokromatografialla (41 s. 6). Patruunan sisällä oleva hartsi sisältää positiivisesti ja negatiivisesti varautuneita ioneja, ja niiden läpi virtaavan veden sisältämät kationit ja anionit sitoutuvat näihin varauksensa vuoksi (42). Hartsin adsorptio- ominaisuudet sitovat myös lukuisia veden sisältämiä orgaanisia epäpuhtauksia. Tämän lisäksi laitteessa on mikrokuitusuodatin partikkelien puhdistamiseksi vedestä sekä ultraviolettilamppu, jonka tuottamat lyhytaaltoiset valonsäteet desinfiioivat vedestä mikrobeja sekä hapettavat kovalenttisesti sitoutuneita hiiliyhdisteitä. (41 s. 6)

Näytteet analysoitiin samoissa kromatografiajoissa laadunvalvonta- tai tuotekehitysryhmän tekemien, hyväksytyin menetelmin tehtyjen näytteiden kanssa. Jos liuotin tai ajoliuos olisi aiheuttanut merkittävää virhettä, olisi se vaikuttanut myös niiden tuloksiin. Hyväksytyllä menetelmällä tehtyjen näytteiden tuloksissa ei kuitenkaan ollut mitään poikkeavaa, joten voidaan todeta, että käytettyjen liuosten laatu on ollut normaali.

Näytteen C menetelmällä tehdyissä testeissä vesi aiheutti huomattavia piikkejä näytteen kuvaajaan. Ne olivat kuitenkin niin kaukana itse näytteen aiheuttamasta piikistä, etteivät vaikuta mittaustulosten onnistumiseen. Veden mahdollinen vaikutus oli tiedossa jo ennen näytteiden analysointia, sillä kyseessä on todella herkästi epäpuhtauksia havaitseva menetelmä. Pelkkää liuotinnäytettä testattiin puhtaammasta vedestä valmistetulla liuottimella, eikä tässä kuvaajassa ollut ylimääräisiä piikkejä.

Vaikka ylimääräiset piikit eivät välttämättä vaikuta tutkittavien aineiden tuloksiin, tulisi käyttää niin puhdasta vettä, ettei niitä esiinny.

14.3 Imu

Pumpun aiheuttama paineen alenema sekä imun kesto säädettiin sopiviksi joka kerta ennen mittausten aloittamista. Käytettyjen paine- ja virtausmittarien epätarkkuudet saattavat aiheuttaa virhettä mittaustuloksiin. Erityisesti virtausmittarin virheestä aiheutunut liian lyhyt imuaika saattaisi johtaa siihen, että osa analysoitavasta lääkeannoksesta jäisi inhalaattoriin.

Paine- ja virtausmittarit kalibroidaan säännöllisesti, jottei niistä aiheutuisi virhettä. Jos imun voimakkuus tai kesto olisi poikkeava, tämä luultavasti havaittaisiin inhalaattoria punnitessa analyysien välissä. Voidaan katsoa, että virtaus ei aiheuta mittaukseen poikkeamaa.

14.4 Ohivirtaus

Mittausten alkuvaiheessa, ravistelunopeuden sekä ravistelun keston vaikutuksia testattaessa, käytettiin Aforen valmistaman analyysiputken vanhaa versiota. Putken halkaisija on suurempi kuin käytetyn suodattimen. Tämän vuoksi osa analysoitavasta näytteestä saattoi virrata suodattimen ohi venttiiliin. Putkella tehdyt mittaukset päätettiin jättää huomioimatta mittaustuloksia käsiteltäessä. Muilla putkilla tehdyissä kokeissa ohivirtausta ei esiintynyt.

14.5 Suodatin

Käytetyn suodattimen sopivuudesta analyysiin ei ollut täyttä varmuutta. Ravistelu saattaa hajottaa suodattimen rakennetta. Jos siitä tämän seurauksena irtoaa nukkaa, saattavat kromatografian mittaustulokset vääristyä. Tarvittaessa suodatinpaperit voitaisiin pestä ennen analyysia, jolloin nukkaa ei enää analyysin aikana irtoaisi. Tästä seuraisi kuitenkin ylimääräinen työvaihe, joka hidastaisi analyysia.

Suodattimen hajoamista testattiin analysoimalla kolme näytettä valmisteesta A pitkäkestoisilla ravisteluilla. Ravisteluiden kestot olivat 30, 60 ja 120 minuuttia. Näytteiden kromatografianalyyseissa ei havaittu poikkeavia tuloksia. Näytteet myös sentrifugoitiin mahdollisen irronneen nukan silmämääräistä arviointia varten. Niiden pinnalla ei kuitenkaan havaittu mitään. Myöskään näytteiden pitoisuuksissa ei havaittu

merkittäviä poikkeamia ravisteluajan kasvaessa. Tästä pääteltiin, että analyysin luotettavuus ei kärsi, vaikka ravistelu aika jostain syystä pitenisikin.

Suodatinpaperin vaikutusta tuloksiin testattiin tuotteiden A ja C menetelmillä. Suodatinpaperia liotettiin liuottimella dekantterilasissa, minkä jälkeen liuottimesta otettiin näyte, joka analysoitiin. Näytteissä ei näkynyt ollenkaan tutkittavia aineita. Havaittiin kuitenkin, että suodatinpaperi aiheuttaa ylimääräisiä piikkejä kromatografian kuvaajaan. Liitteen 1 kuvissa 1, 3 ja 4 olevissa kuvaajissa voidaan nähdä noin kahden minuutin kohdalla piikkejä, joita ei ole saman liitteen kuvassa 2 olevassa, optimaalista standardinäytettä esittävässä kuvaajassa. Koska piikit näkyvät myös kuvassa 4 eli pelkästä puhtaasta suodatinpaperista otetusta näytteestä tehdyssä kromatografimittauksessa, voidaan niiden katsoa olevan suodatinpaperin aiheuttamia. Piikit ovat kuitenkin niin kaukana tutkittavien aineiden aiheuttamista piikeistä, etteivät ne käytännössä vaikuta analyysin tuloksiin.

Samankaltainen ilmiö on havaittavissa myös tuotteen C kromatografiajoiden kuvaajista. Liitteen 1 kuvaajassa 10, joka esittää puhtaasta suodatinpaperista tehdyn näytteen analyysia tuotteen C kromatografimenetelmällä, on havaittavissa 4-7 minuutin kohdalla piikkejä, jotka puuttuvat kuvan 8 kuvaajasta. Tämä kuva esittää optimaalisen kromatografiajon etenemistä. Piikit tulevat tälläkin kertaa niin paljon ennen varsinaista näytettä, etteivät ne vaikuta saatuihin pitoisuuksiin.

Myös tuotteen D nollanäytteissä havaittiin ylimääräisiä piikkejä. Ne eivät myöskään vaikuttaneet tutkittavan aineen pitoisuuden tuloksiin. Pelkästä suodatinpaperista ei otettu erikseen näytettä, joten ei voida olla varmoja, mikä putken osista aiheuttaa piikit. Luultavasti kyseessä on suodatin, mutta koska käytetty liuotin on eri kuin näytteiden A ja C analyysissä, ei tästä voida olla varmoja. Suodatinpaperi tulisi analysoida erikseen tällä menetelmällä, jotta tästä saataisiin varmuus.

Näytteen B analyysissä putki ei sen sijaan aiheuta mitään ylimääräistä kromatografian kuvaajaan. Liitteen 1 kuvassa 5 oleva standardinäytteen kuvaaja sekä kuvassa 6 oleva analysoidun näytteen kuvaaja sisältävät samat piikit.

14.6 Analyysiputki

Mittauksissa käytetty liuotin saattaa irrottaa kemiallisia yhdisteitä analyysiputkesta ja siihen kiinnitetyistä osista. Tämän tapahtuessa saattavat irronneet yhdisteet vaikuttaa tuloksiin. Koska eri tuotteet analysoidaan erilaisilla liuottimilla, on putken oltava sellainen, ettei se reagoi minkään niistä kanssa. Erityisen tärkeää putken osien vaikutus tuloksiin on tarkasteltaessa Aforen valmistamaa putkea, joka on vielä kehittäelyvaiheessa ja jonka ominaisuuksiin voidaan vielä vaikuttaa.

Tuotteen A analyysissa käytetyllä menetelmällä Aforen uusitulla putkella tehdyissä nollanäytteissä oli ylimääräisiä piikkejä kromatografian kuvaajassa. Piikit olivat kuitenkin niin kaukana varsinaisen näytteen aiheuttamista piikeistä, etteivät ne vaikuttaneet mittaustuloksiin. Nollanäytteissä ei analyysin mukaan ollut ollenkaan vaikuttavaa ainetta. Myöskään muiden tuotteiden nollanäytteissä ei tutkittavia aineita näkynyt.

Tästä huolimatta päätettiin selvittää, mikä putken osista aiheuttaa ylimääräiset piikit kuvaajassa. Putken eri osista liuotettiin näytteet dekantterilasissa. Näytteet analysoitiin tuotteen D tutkimisessa käytetyllä menetelmällä. Menetelmään päädyttiin, koska se on kaikkein tarkin epäpuhtauksien havaitsemisessa. Näytteet epäonnistuivat, sillä liuottimessa käytetty vesi ei ollut riittävän puhdasta kyseistä analyysia varten, eikä tuloksia siis saatu. Mittaus luultavasti uusitaan tulevaisuudessa paremmin puhdistettua vettä käyttäen.

Putken osista irtoaviin epäpuhtauksiin voitaisiin mahdollisesti vaikuttaa pesemällä putki huolellisesti, ennen kuin se otetaan käyttöön. Useampi peräkkäinen koneellinen pesu luultavasti vähentäisi putkesta irtoavien epäpuhtauksien määrää. Niihin ei kuitenkaan ollut aikaa tätä tutkimusta tehtäessä. Myös eri osien materiaalivalinnat saattavat vaikuttaa häiriöihin mittauksissa, mutta niiden tutkiminen on hidasta ja kallista. Osia tulisi teettää jokaisesta halutusta materiaalista ja vertailla näiden antamia tuloksia.

Sovitekappaletta, johon inhalaattori kiinnitetään, testattiin tuotteen A menetelmällä. Sovitekappaletta liotettiin dekantterilasissa liuottimessa, josta otettiin näyte analyysiin. Näytteissä ei näkynyt ollenkaan tutkittavaa ainetta, mutta niissä oli ylimääräisiä piikkejä. Tämän vuoksi voidaan olettaa, että käytettäessä jostain muusta materiaalista valmistettua sovitekappaletta ei ylimääräisiä piikkejä välttämättä tulisi. Sovitekappale oli ollut käytössä jo pitkään, joten sen aiheuttamiin piikkeihin ei voida vaikuttaa pesun avulla.

14.7 Ympäristö

Tutkittava aine on inhalaattorissa hienojakoisena jauheena. Siten sillä on suuri pinta-ala, ja se on herkkä ympäristön vaikutuksille. Liian korkea tai matala lämpötila saattaa vaikuttaa aineen ominaisuuksiin. Erityisen herkkä jauhe on ilmankosteudelle. Liian suuri kosteus imeytyy jauheeseen, jolloin se saattaa paakkuuntua eikä inhalaattori välttämättä toimi halutulla tavalla.

Tutkimuslaboratorion olosuhteet oli pyritty säätämään optimaaliseksi tutkittavien aineiden kannalta. Ilmankosteus ja lämpötila tarkastettiin määräajoin. Jos jompikumpi näistä muuttui haluttujen raja-arvojen ulkopuolelle, valvontajärjestelmä antoi hälytyksen välittömästi. Näin tapahtuikin erityisesti ulkoilman lämpötilan noustessa korkeaksi. Raja-arvot oli kuitenkin säädetty niin lähelle optimaalisia olosuhteita, etteivät niistä ilmenneet poikkeamat vaikuttaneet kertaakaan tuloksiin.

15 Testausmenetelmän kehittäminen tulevaisuudessa

15.1 Testauksen ongelmakohdat

Testattavasta inhalaattorista otetaan kymmenen näytettä lääkejauheen pitoisuusanalyysia varten. Kaikki testi-inhalaattorin sisältämät annokset kuitenkin imetään analyysiputkeen inhalaattorin mekanismin testaamiseksi, vaikkei niitä analysoidakaan. Inhalaattoria on ravisteltava aina ennen annoksen vapautusta. Käsintehdynä tämä on hidasta, sillä inhalaattori sisältää 120-200 annosta. Työpäivän aikana laborantti ei ehdi testata kuin muutaman inhalaattorin tällä hetkellä käytössä olevalla menetelmällä. Lisäksi inhalaattorin ravistelu ja laukaisimen painelu on fyysisesti kuluttavaa työntekijälle.

Aforen putkea sekä Heidolphin ravistelijaa hyödyntämällä tehtyjä testauksia voidaan tehdä useita rinnakkain. Kun lasiputkessa näytteet on liuotettava yksitellen, pystytään näiden avulla ottamaan rinnakkaisia näytteitä, jotka liuotetaan samanaikaisesti. Näytteet imetään putkiin, jokaiseen lisätään liuotin ja putket ravistellaan yhtä aikaa. Näin kulunut aika yhtä näytettä kohti lyhenee merkittävästi. Ravistelijaan voidaan kiinnittää kahdeksan näyteputkea, joten ainakin näin monen inhalaattorin analysointi olisi mahdollista samanaikaisesti. Määrää voidaan kasvattaa käyttämällä useampaa ravistelijaa.

Väliannosten käsin ottaminen on tästä huolimatta esteenä rinnakkaisten näytteiden tekemiselle. Tätä työvaihetta pyritään nopeuttamaan tulevaisuudessa käyttämällä inhalaattorien analysointiin suunniteltua, englantilaisen RTS Life Science Ltd:n valmistamaa robottia (kuva 13). Robotti tekee väliannosanalyysit eli ravistelee inhalaattorin, vapauttaa annoksen, imee sen inhalaattorista ja punnitsee inhalaattorin. Mittaustuloksista voidaan jälkeenpäin todeta, onko inhalaattorista saatujen annosten koko sopiva.



Kuva 13. RTS Life Science Ltd:n valmistama analyysirobotti. (43)

Väliannosten analysointi inhalaattorista kestää suunnilleen yhtä kauan robotin tekemänä tai lasiputken avulla käsin tehtynä. Robottiin voidaan kuitenkin laittaa kolme analysoitavaa inhalaattoria rinnakkain, mikä nopeuttaa analyysia huomattavasti näytemäärän ollessa suuri. Väliannosten analysointi tapahtuu automaattisesti robotissa valmiina olevan ohjelman mukaan eikä vaadi juurikaan työvoimaa.

15.2 Testaus jatkossa

Ennen kuin tässä raportissa esitelty testausmenetelmä voidaan ottaa käyttöön, on sen toimivuus vielä varmistettava jokaiselle tuotteelle, jonka testaamiseen sitä aiotaan käyttää. Tehty näytemäärä ei ole riittävä, jotta menetelmän voitaisiin katsoa olevan tarpeeksi luotettava. Hyväksytyn menetelmän testaamiseksi ei ole asetettu viranomaisten toimesta vaadittavaa näytemäärää, vaan menetelmää kehittävä taho voi itse arvioida, montako näytettä tarvitaan toistettavuuden osoittamiseksi. (44)

Lääketuotantoa ja kauppaa valvovat viranomaiset ovat kuitenkin asettaneet tarkat rajat sille, kuinka paljon tuotteesta otetut näytteet saavat poiketa ilmoitetusta pitoisuudesta ja toisistaan. Jotta näytteille mitatut pitoisuudet eivät poikkeaisi toisistaan epätarkan menetelmän vuoksi, on näytteenvalmistusmenetelmän luotettavuus varmistettava riittävällä määrällä rinnakkaisia testejä. Pitoisuuden HPLC-määrittämenetelmän tarkkuusvaatimus on suuri, ja poikkeavuuksien pysyminen sallituissa rajoissa on pystyttävä osoittamaan viranomaisille tuotteen myyntilupahakemuksessa.

Jokaisesta valmistetusta inhalaattorierästä testataan useampi kappale. Koska tuotteiden valmistusmäärät ovat suuria, voidaan analyysia kehittämällä säästää merkittävästi työvoimakustannuksissa. Jos testaamisessa hyödynnetään Copleyn ravistelijaa sekä RTS:n robottia, vähenee työvoiman tarve huomattavasti, sillä nestekromatografilla analysoitavien näytteiden liuotus ja väliannosten ottaminen inhalaattorista tapahtuvat automaattisesti. Työvoimaa tarvittaisiin enää analysoitavien annosten valmistelussa, näytteen ottamisessa ravistelun jälkeen, väliannosanalyysin käynnistämisessä sekä kromatografiajon käynnistämisessä.

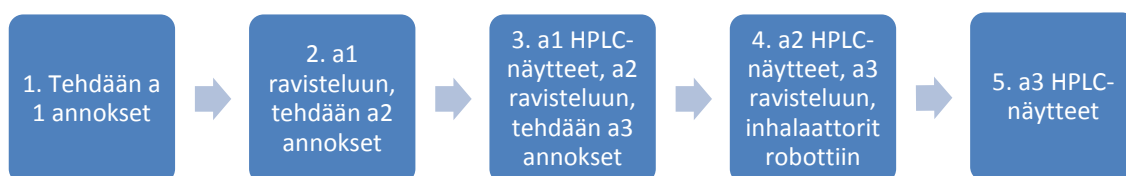
15.3 Hahmotelma analyysille ravistelijaa ja robottia hyödyntäen

Analyysi tulisi suunnitella siten, että sen eri vaiheet tehdään inhalaattoreille porrastetusti. Ravistelun aikana voidaan ottaa inhalaattoreista seuraavia HPLC-näytteitä analyysiputkiin. Samanaikaisesti osa inhalaattoreista voi olla robotissa väliannosanalyysien mittauksessa. Robotti pystyy analysoimaan kerralla kolme inhalaattoria. Tätä useamman rinnakkaisnäytteen analysointi ei luultavasti onnistu. HPLC-analyysi on melko pitkäkestoinen, joten näytemäärän kasvaessa sekin saattaa muodostua pullonkaulaksi. Alla on hahmotelma siitä, miten kuusi inhalaattoria saadaan analysoitua tehokkaasti robottia ja ravistelijaa hyödyntämällä.

1. Kolmesta inhalaattorista (a) valmistetaan HPLC-näytteet (a1) imemällä jauhenäyte analyysiputkeen ja lisäämällä liuotin.
2. Näytteiden (a1) ollessa ravistelijassa valmistellaan toiset näytteet (a2) samoista inhalaattoreista liuotusta varten.
3. Toiset näytteet (a2) laitetaan ravistelijaan, ja samaan aikaan ensimmäisistä näytteistä (a1) otetaan HPLC-näytteet. Ravistelun vielä jatkuessa otetaan kolmannet näytteet (a3) liuotusta varten.

4. Kolmansien näytteiden (a3) ollessa ravistelussa toisista näytteistä (a2) otetaan HPLC-analyysia varten näytteet vialeihin, ja inhalaattorit laitetaan robottiin väliannosanalyysia varten.
5. Kun kolmannet näytteet (a3) on saatu liuotettua, otetaan niistäkin HPLC-analyysiin tarvittava näyte.

Edellä kuvatut työvaiheet on esitetty järjestyksessä kuvassa 14, joka havainnollistaa, miten kolmen inhalaattorin analysoitavat näytteet voidaan valmistaa rinnakkain ravistelijaa hyödyntäen.

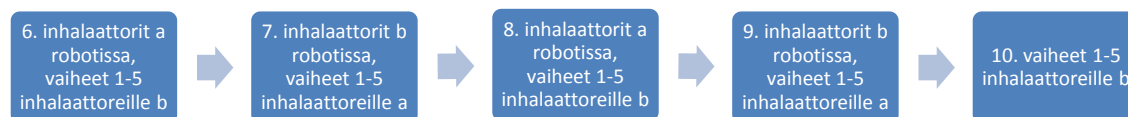


Kuva 14. Inhalaattorinäytteiden valmistuksen kulku

6. Tämän jälkeen inhalaattorien väliannokset analysoidaan robotilla. Väliannosanalyysin aikana kolmesta muusta inhalaattorista (b) voidaan valmistaa näytteet kromatografiajooa varten kohtien 1-5 mukaisesti.
7. Kun inhalaattorien (a) ensimmäiset väliannokset on analysoitu, voidaan toiset kolme inhalaattoria (b) laittaa robottiin väliannosanalyysia varten. Robotin mitatessa inhalaattorien (b) väliannoksia voidaan ensimmäisten inhalaattorien (a) keskimmäiset HPLC-analyysinäytteet valmistaa, kuten kohdissa 1-5 tehdään.
8. Kun inhalaattorien (a) keskimmäiset HPLC-analyysinäytteet on valmistettu, voidaan inhalaattorien (b) keskimmäiset näytteet valmistaa ja inhalaattorit (a) siirtää robottiin toista väliannosanalyysia varten.
9. Tämän jälkeen inhalaattorien (a) viimeiset HPLC-analyysinäytteet valmistetaan, ja inhalaattorien (b) toiset väliannokset mitataan robotin avustuksella samaan aikaan.
10. Lopuksi inhalaattorien (b) viimeiset HPLC-näytteet valmistetaan.

Näin toteutettu analyysinäytteiden valmistus on esitetty kuvassa 15 josta nähdään, miten kahden, kolmesta inhalaattorista muodostuvan sarjan näytteenotto voidaan järjestää rinnakkain. Näin tehtynä kuuden inhalaattorin HPLC-näytteiden valmistelu

sekä väliannosten mittaaminen vie vain hieman enemmän aikaa kuin vanhalla menetelmällä tehty yhden inhalaattorin analysointi. Päivän aikana edellä kuvaillun analyysin ehtii toistaa ainakin kaksi, mahdollisesti jopa kolme kertaa.



Kuva 15. Inhalaattorinäytteiden valmistus robottia hyödyntäen

Markkinoilla on myös robotteja, jotka väliannosten lisäksi valmistavat HPLC-analyysiin tarvittavat näytteet (45). Tällaisen laitteiston käyttö vähentäisi työvoiman tarvetta entisestään. Uuden laitteiston hankinta voi kuitenkin tulla niin kalliiksi, ettei se olisi kannattavaa. Lisäksi pitäisi olla varmuus näytteenoton ja liuotuksen onnistumisesta robotin tekemänä.

16 Yhteenveto

Voidaan katsoa, että työn kuluessa saatiin kehitettyä toimiva, aiempaa nopeampi ja kevyempi analyysimenetelmä inhalaattoreille A ja B käyttäen apuna Heidophlin ravistelijaa sekä Copleyn valmistamaa analyysiputkea. Aforen valmistamaa putkea saatiin paranneltua, ja sen todettiin olevan kelvollinen ainakin tuotteen A laadunvarmistuksessa. Lisäksi voidaan olettaa, että tuotteiden B, C ja D analysointi onnistuu näitä välineitä hyödyntäen, mutta rinnakkaisia mittauksia ei ehditty tehdä niille tarpeeksi, jotta tästä voitaisiin olla varmoja.

Uutta menetelmää ei kuitenkaan voida vielä ottaa käyttöön. Rinnakkaisnäytteiden määrä riittää jo osoittamaan, että valitut parametrit ovat optimaalisia näytteen käsittelyssä, mutta niitä on tehtävä vielä huomattavasti lisää ennen kuin menetelmän toistettavuudesta voidaan olla varmoja.

Vaikka nopeampi menetelmä näytteiden valmistamiseksi kromatografiajoa varten löydettiin, on menetelmässä vielä paranneltavaa. Inhalaattorin väliannosten ottaminen veisi edelleen suuren osan analyysiin käytettävästä ajasta ja sitoi paljon työvoimaa. Sen automatisoiminen robotin avulla lienee seuraava askel analyysia kehiteltäessä.

Lähteet

1. Laitinen, Lauri; Juntunen-Backman, Kaisu; Hedman, Jouni; Ojaniemi, Seija. 2000. Astma. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, Hengityслиitto Heli ry.
2. Kinnula, Vuokko; Brander, Pirkko; Tukiainen, Pentti. 2005. Keuhkosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
3. Yleistä hengityselimistä. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti. <
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/hengitys/>>. Luettu 18.1.2011.
4. Kangasniemi, Kaija. 2001. Keuhkot ja hengitys. 2001. Helsinki: Oy Valitut palat.
5. Terve ja sairas keuhkoputki. 2009. Verkkodokumentti. Merck Sharp & Dohme corp. <
http://www.parempaaelamaa.fi/astma/mita_astma_on/terve_ja_sairas_keuhkoputki>
. Luettu 18.1.2011.
6. Bass, Pat. 2009. Asthma & Your Immune System. Verkkodokumentti. About.com. <
http://asthma.about.com/od/asthmabasics/a/Asthma_Immune.htm>. 13.1.2009.
Luettu 2.10.2010.
7. Bass, Pat. 2009. What Are Inhaled Corticosteroids? Verkkodokumentti. About.com. <
<http://asthma.about.com/od/treatmentoptions/a/ics.htm>>. 9.11.2009. Luettu
2.10.2010
8. Bass, Pat. 2009. Definition of Mast Cells. Verkkodokumentti. About.com. <
http://asthma.about.com/od/glossary/g/DEF_mastcell.htm>. 29.12.2009. Luettu
2.10.2010
9. Bass, Pat. 2010. What Is a Basophil? Verkkodokumentti. About.com. <
http://asthma.about.com/od/glossary/g/gloss_basophil.htm>. 22.2.2010. Luettu
2.10.2010.
10. Bass, Pat. 2009. Definition of Hyperresponsiveness. Verkkodokumentti. About.com. <
http://asthma.about.com//od/glossary/g/def_hyperresponsiveness.htm>. 18.8.2009.
Luettu 2.10.2010.
11. Haahtela, Tari. 2009. Antikolinergit. Verkkodokumentti. Duodecim. <
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=alg00209>.
20.11.2009. Luettu 5.1.2011.
12. Orionin kaksi ensimmäistä vuosikymmentä. 2009. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Historia/>>. 19.5.2009. Luettu 19.10.2010.
13. 1960- ja 1970-lukujen vaiheita. 2009. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Historia/Orionin-90-vuotta/>>. 27.5.2009. Luettu 19.10.2010.

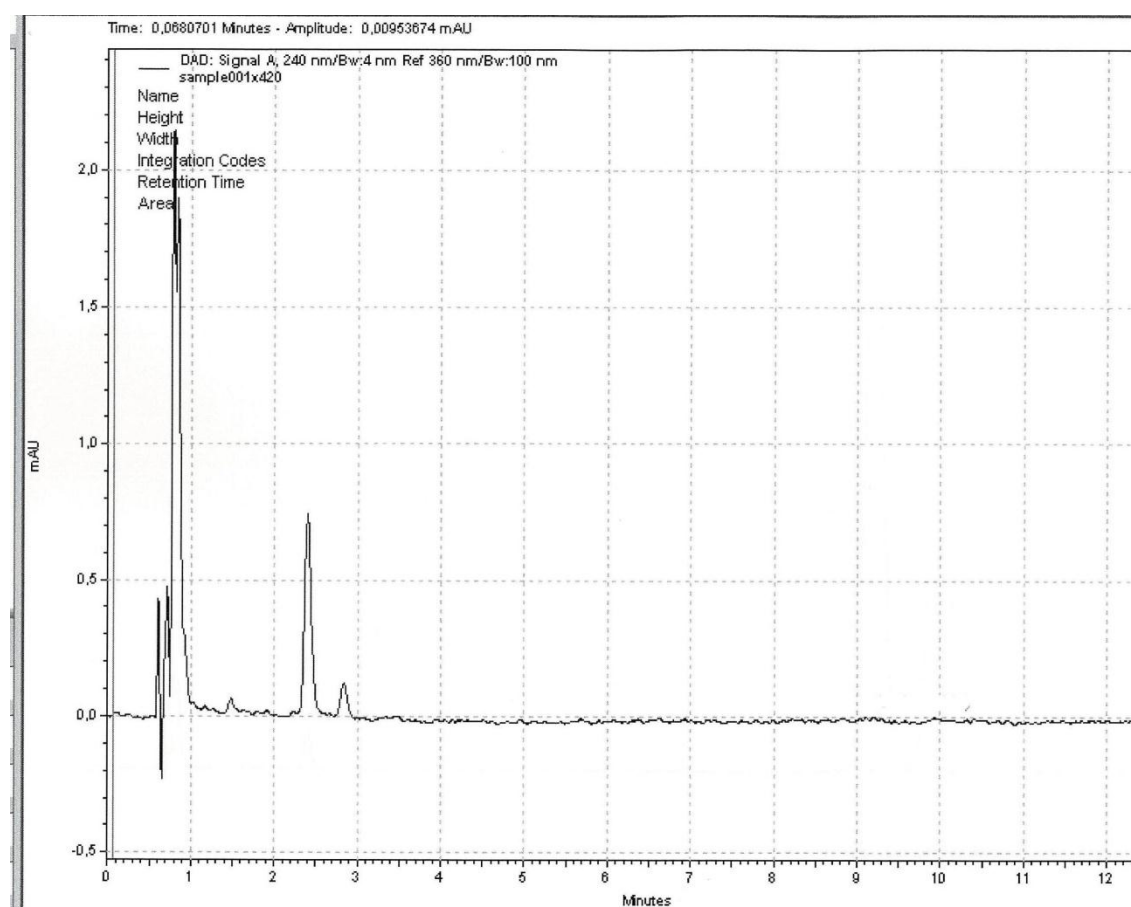
14. Jakautuminen 30.6.2006. 2009. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Historia/Jakautuminen-3062006/>>. 27.5.2009. Luettu
19.10.2010.
15. Tulosityksiköt. 2009. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Tulosityksikot/>>. 26.5.2009. Luettu 19.10.2010
16. Vaikuttavat aineet. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/fi/Tuotteet-ja-palvelut/Fermion/>>. 16.2.2010. Luettu 19.10.2010
17. Orion lyhyesti. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Orion-yrityksena/>>. 9.3.2010. Luettu 19.10.2010.
18. Suurimmat lääkkeiden valmistajat ja markkinoijat 2010. 2011. Verkkodokumentti.
Suomen lääkedata Oy. <
[http://www.laaketeollisuus.fi/Banners/Suurimmat%20valmistajat%20ja%20markkinoij
at%202010.pdf](http://www.laaketeollisuus.fi/Banners/Suurimmat%20valmistajat%20ja%20markkinoij%202010.pdf)>. Luettu 25.1.2011.
19. Lääkkeet ihmisille. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Tuotteet-ja-palvelut/Reseptilaakkeet-ihmisille/>>. 30.8.2010. Luettu
18.10.2010
20. Myydyimmät lääkevalmisteet. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Orion-yrityksena/Myydyimmat-tuotteet>>. 9.3.2010. Luettu
19.10.2011.
21. Kymmenen myydyintä lääkevalmistetta Suomessa 2010. 2011. Verkkodokumentti.
Suomen lääkedata Oy. <
[http://www.laaketeollisuus.fi/Banners/Myydyimm%C3%A4t%20l%C3%A4%C3%A4ke
almisteet%20Suomessa%202010.pdf](http://www.laaketeollisuus.fi/Banners/Myydyimm%C3%A4t%20l%C3%A4%C3%A4kevalmisteet%20Suomessa%202010.pdf)>. Luettu 25.1.2011.
22. Kymmenen suurinta lääkeyritystä vuonna 2007. 2008. Verkkodokumentti.
Lääketietokeskus. <
http://www.laaketietokeskus.fi/tiedostot/10-suurinta_laakeyritysta_2007_s192.pdf>.
Luettu 25.1.2011.
23. Lääkeala murroksessa. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
<http://www.orion.fi/Orion/Toimintaymparisto/Laakemarkkinat/>>. 14.4.2010. Luettu
19.10.2010
24. Organisaation taustakuvaus. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. <
[http://www.orion.fi/Vastuullisuus/Orion-yv-raportti-2009/Organisaation-
taustakuvaus/](http://www.orion.fi/Vastuullisuus/Orion-yv-raportti-2009/Organisaation-taustakuvaus/)>. 21.6.2010. Luettu 21.1.2011.

25. Inhaloitavat lääkkeet- Easyhaler. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. < <http://www.orion.fi/Tutkimus-ja-tuotekehitys/Tutkimusalueet/Inhaloitavat-laakkeet---Easyhaler-/>>. 16.12.2010. Luettu 27.1.2011
26. Mattila, Terhi. 2010. Erikoistutkija, Orion Oyj, Kuopio. Sähköpostiviesti 8.11.2010.
27. Inhalation Devices. 2011. Verkkodokumentti. Admit. < <http://www.admit-online.info/index.php?id=246&L=0>>. Luettu 25.1.2011
28. Juntunen-Backman, K; Kajosaari, M; Laurikainen, K; Malinen, A; Kaila, M; Mustala, L; Kaski, U; Linna, O; Marenk, M; Toivanen, P. Comparison of Easyhaler Metered-Dose, Dry Powder Inhaler and a Pressurized Metered-Dose Inhaler Plus Spacer in the Treatment of Asthma in Children. 2002. Verkkodokumentti. Medscape. < <http://www.medscape.com/viewarticle/446869>>. 1.8.2003. Luettu 14.1.2011.
29. Chrystyn, Henry. Closet to an 'Ideal Inhaler' With the Easyhaler: Conclusion. 2005. Verkkodokumentti. Medscape. < http://www.medscape.com/viewarticle/531818_6>. Luettu 9.11.2010.
30. Tutkimusputkessa olevat T&K-projektit. 2010. Verkkodokumentti. Orion Oyj. < <http://orion.fi/fi/Sijoittajille/Orion-sijoituskohteena/TK-lyhyesti/Laaketutkimus--ja-kehityspotki/>>. 19.11.2010. Luettu 25.1.2011.
31. Yritys. 2010. Verkkodokumentti. Afore Oy. < <http://www.aforeconsulting.fi/?sivu=yritys>>. Luettu 12.11.2010.
32. Afore on innovatiivinen ja kokenut tuotantoautomaatoyritys. 2010. Verkkodokumentti. Afore Oy. < <http://www.afore.fi/fi/yritys>>. Luettu 12.11.2010.
33. Reax 20/4. 2010. Verkkodokumentti. Heidolph. < <http://www.heidolph-instruments.co.uk/index.php?id=268&L=3>>. Luettu 30.8.2010
34. Power Blending. 2010. Verkkodokumentti. Glen Mills Inc. < http://www.glenmills.com/index-powder_blending.shtml>. Luettu 14.1.2011.
35. OVA-ohje: asetonitrili. 2011. Verkkodokumentti. Työterveyslaitos. < <http://www.ttl.fi/ova/asetonit.html>>. 13.1.2011. Luettu 27.1.2011.
36. OVA-ohje: metanoli. 2011. Verkkodokumentti. Työterveyslaitos. < <http://www.ttl.fi/ova/metanoli.html>>. 13.1.2011. Luettu 27.1.2011.
37. 2008. Käyttöturvallisuustiedote. Sisäinen dokumentti. Espoo: Orion Oyj. Päivitetty 9.1.2009.
38. Mattila, Terhi. 2010. Erikoistutkija, Orion Oyj, Kuopio. Sähköpostiviesti 15.11.2010.

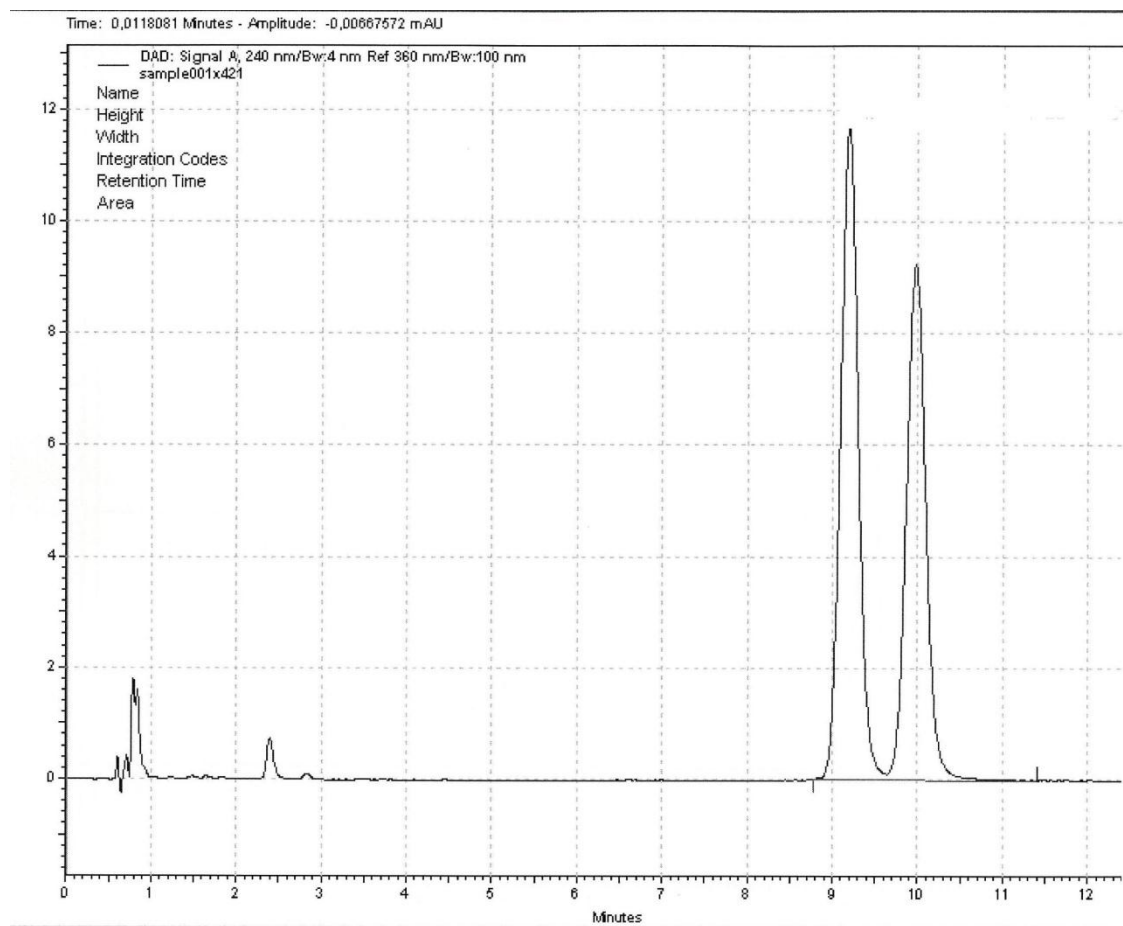
39. Reliable Type III Water For Primary Grade Applications. 2009. Verkkodokumentti. Veolia Water Solutions & Technologies. < <http://www.elgalabwater.com/purelab-prima-7-15-30-en.html>>. Luettu 24.11.2010
40. Käänteisosmoosi. Verkkodokumentti. Oy Watman Ab.< <http://www.watman.fi/k%E4%E4nteisosmoosi/>>. Luettu 22.2.2010.
41. PURELAB Maxima. Verkkodokumentti. Elga LabWater. < <http://photos.labwrench.com/manuals/1096-959.pdf>>. Luettu 24.11.2010
42. Kromatografia. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti. < <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kromatografia/>>. Luettu 24.11.2010
43. pMDI Waste Fire Walkaway Systems. 2005. Verkkodokumentti. RTS Life Science. < http://www.rts-group.com/products/1587_645_pmdi-waste-fire-walkaway-systems.htm>. Luettu 27.1.2011.
44. Mattila, Terhi. 2010. Erikoistutkija, Orion Oyj, Kuopio. Sähköpostiviesti 22.12.2010.
45. Fully Automated Inhaler Testing. 2005. Verkkodokumentti. RTS Life Science. < http://www.rts-group.com/solutions/1586_643_fully-automated-inhaler-testing.htm>. Luettu 20.12.2010.

Liite 1

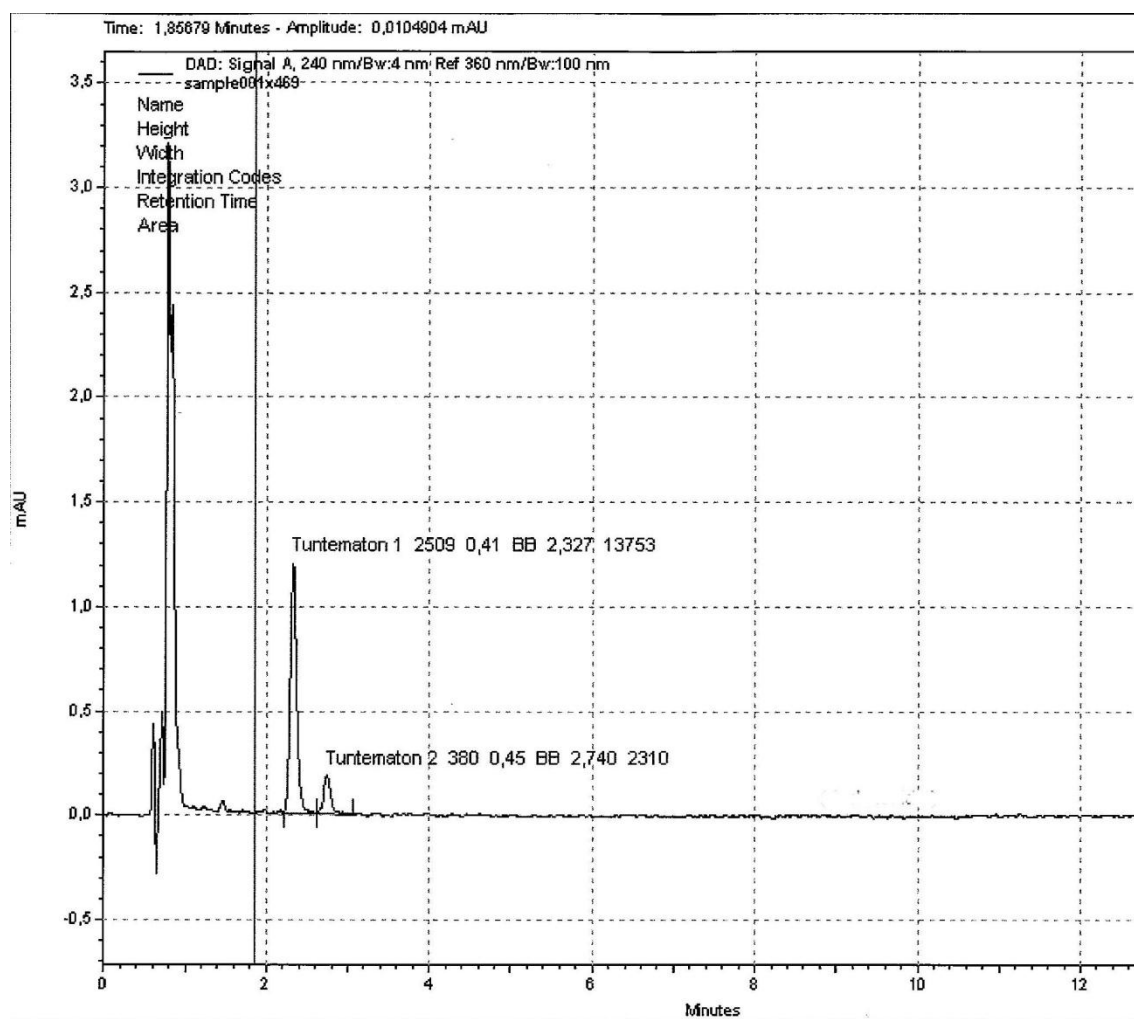
Kromatografiajojen kuvaajia



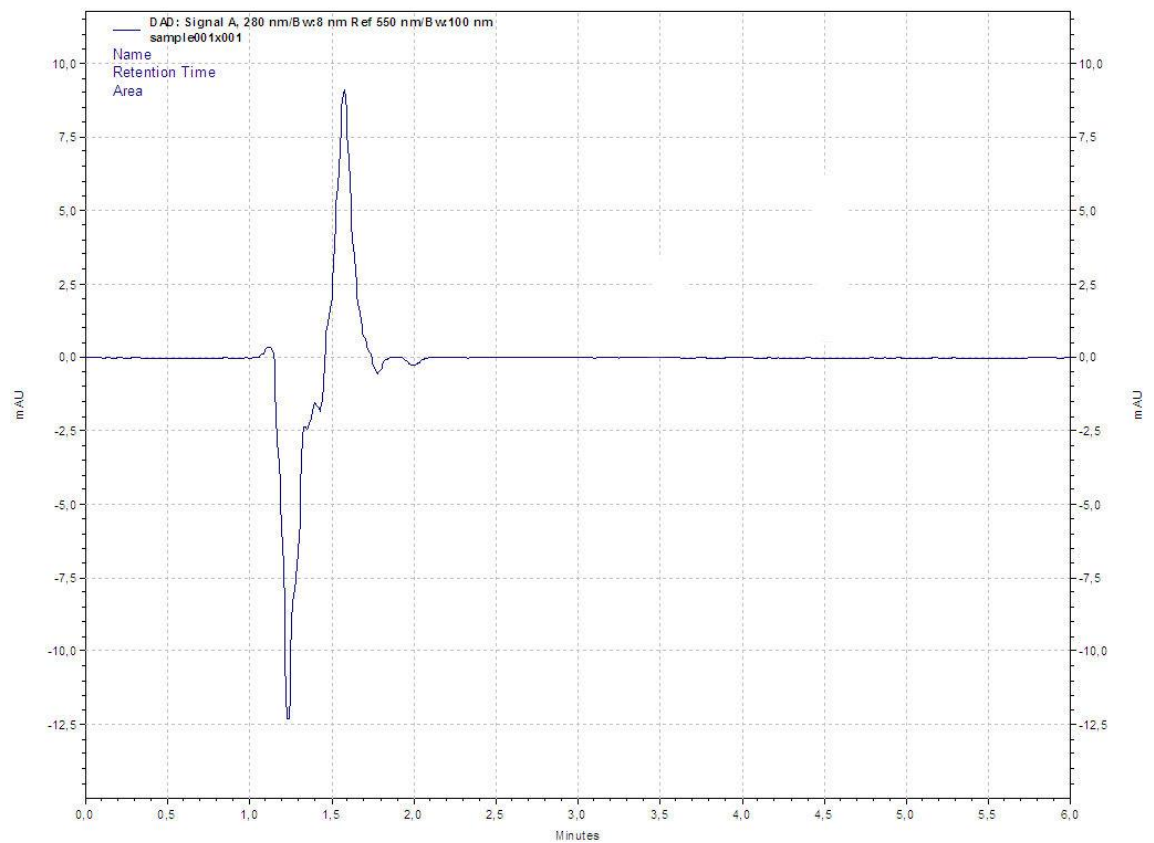
Kuva 1. Tuotteen A nollanäytteen kromatografiajon kuvaaja.



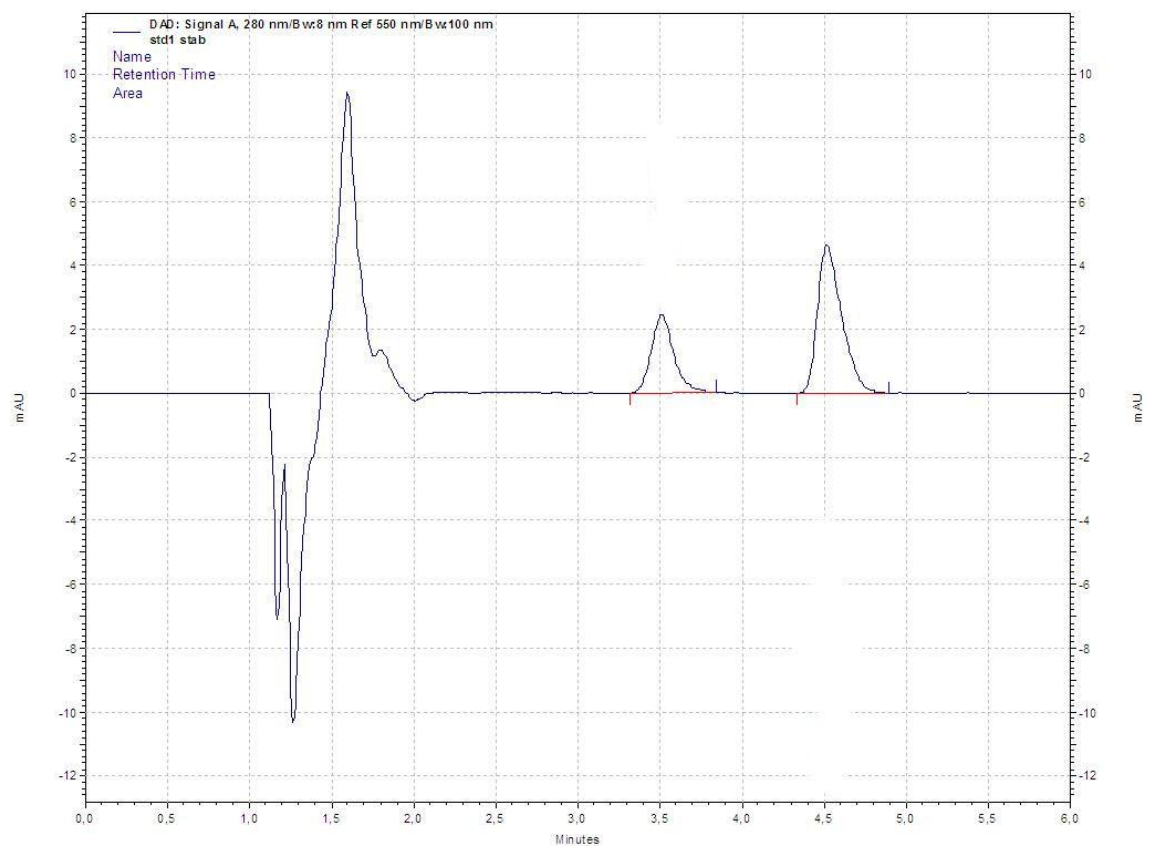
Kuva 3. Tuotteen A analysoidun näytteen kromatografiajon kuvaaja.



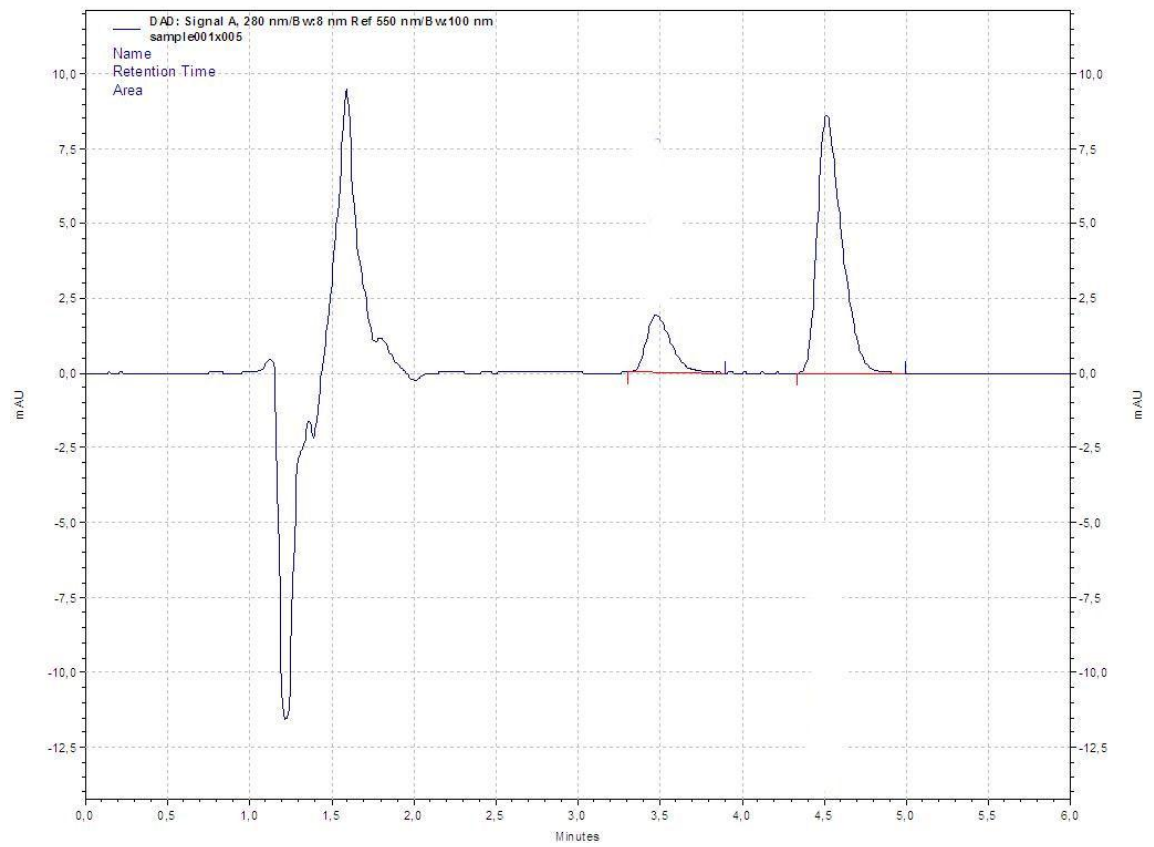
Kuva 4. Puhtaan suodatinpaperin tuotteen A menetelmällä tehdyn kromatografiajon kuvaaja



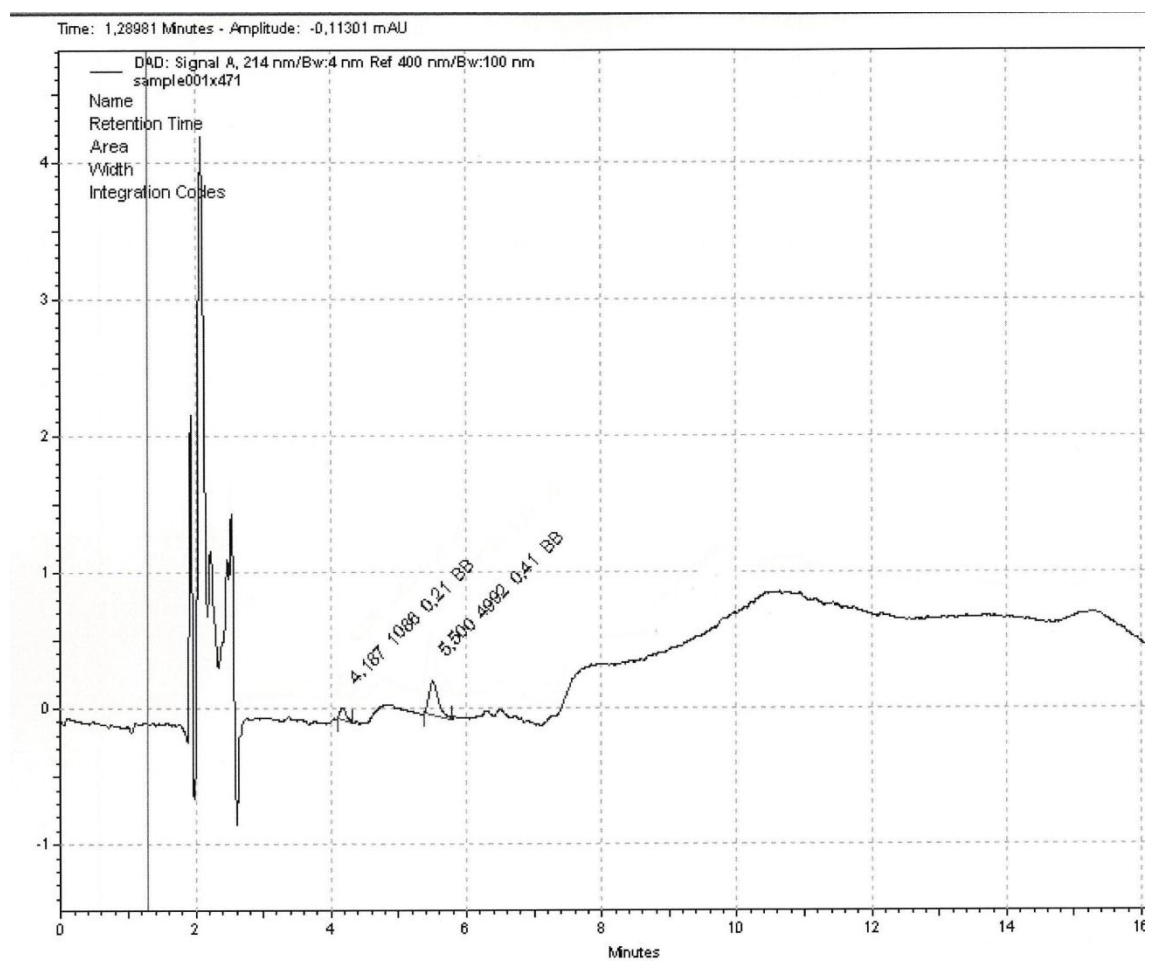
Kuva 5. Tuotteen B nollanäytteen kromatografiajon kuvaaja.



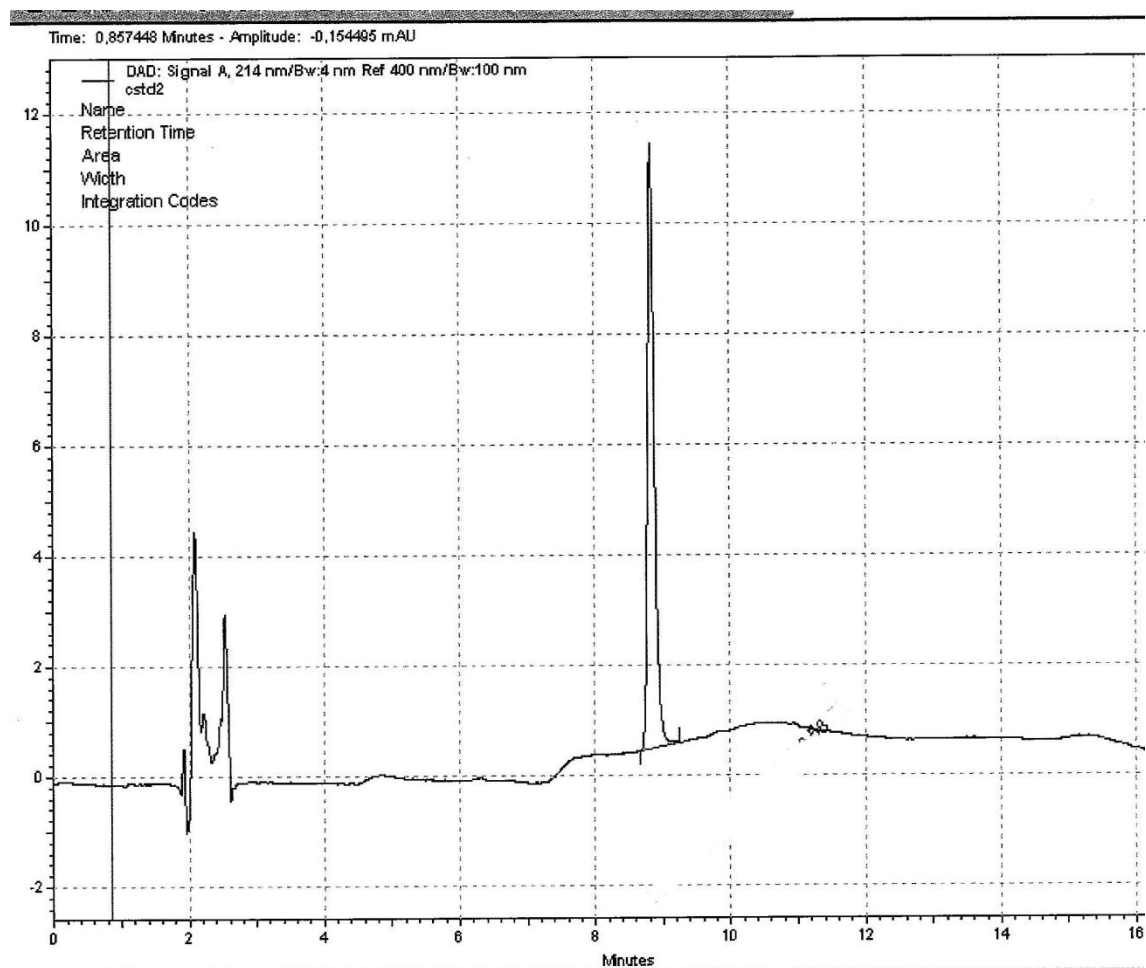
Kuva 6. Tuotteen B standardinäytteen kromatografiajon kuvaaja



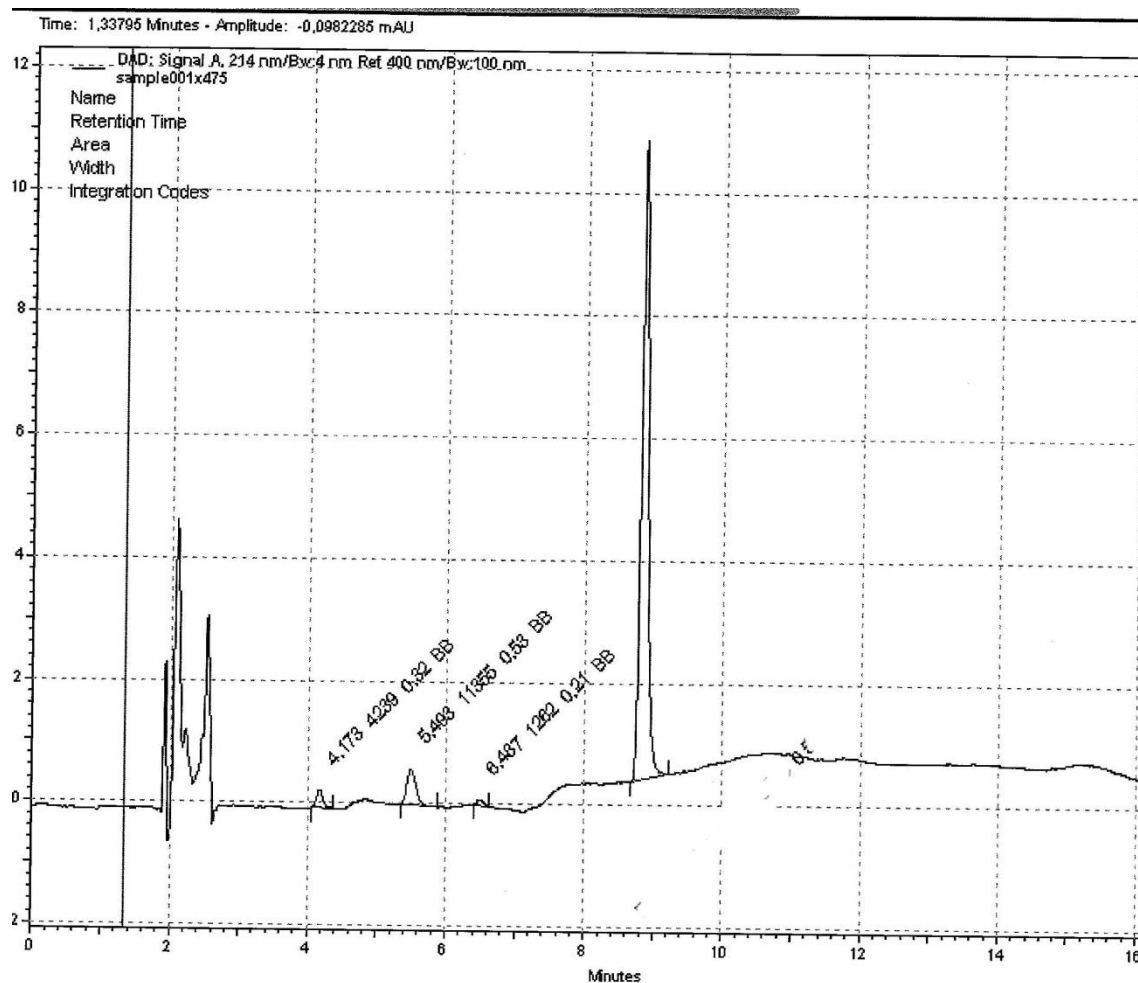
Kuva 7. Tuotteen B analysoidun näytteen kromatografiajon kuvaaja



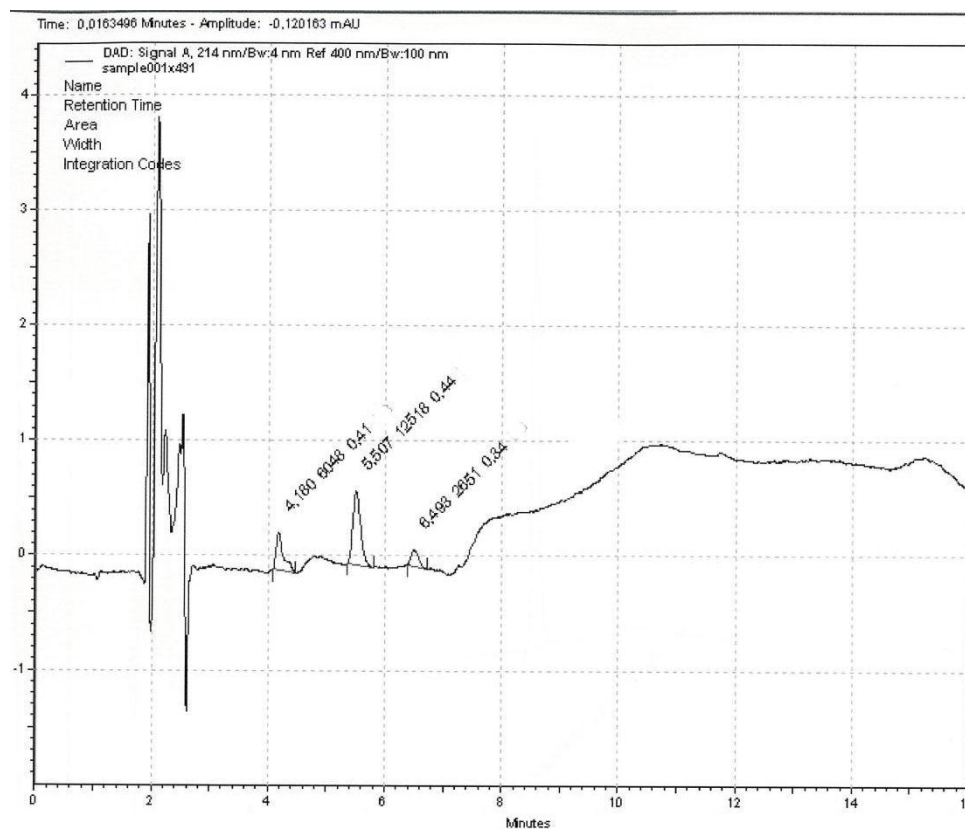
Kuva 8. Tuotteen C nollanäytteen kromatografiajon kuvaaja.



Kuva 9. Tuotteen C standardinäytteen kromatografiajon kuvaaja.



Kuva 10. Tuotteen C analysoidun näytteen kromatografiajon kuvaaja



Kuva 11. Puhtaasta suodatinpaperista otetun, tuotteen C menetelmällä analysoidun näytteen kromatografiajon kuvaaja.